

Erfahrungen
mit einem Progesteron-Schnelltest
in der Rinderbesamung

Frederick Mgongo

Disbui. München

1988

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

Erfahrungen mit einem Progesteron-Schnelltest in der
Rinderbesamung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Frederick Mgongo
aus
Morogoro, Tansania

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

meinen Kindern, meinen Eltern
und meiner Frau Sophia Nyamizi
in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	3
2.1. Brunstzyklus beim Rind	3
2.2. Ovarieller Zyklus	4
2.3. Entwicklung des Progesterontests	6
2.4. Progesteronbestimmung im Blut	8
2.5. Progesteronbestimmung in der Milch	9
2.6. Die Anwendung des Milchprogesteron-Schnelltests	13
2.6.1. Brunsterkennung	16
2.6.2. Trächtigkeitsnachweis	19
2.6.3. Kontrolle von Fertilitätsstörungen	20
2.6.4. Absicherung und Kontrolle therapeutischer Maßnahmen	21
2.6.5. Embryotransfer	22
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1. Materialien, Geräte und Reagenzien	23
3.2. Vorversuch	26
3.2.1. Einfluß der Art des Gemelkes und des Intervalls zwischen Melkzeit und Probenentnahme auf die Progesteronkonzentration	26
3.2.2. Einfluß des Zellgehaltes der Vollmilch (Schalm-Test) auf die Progesteronkonzentration	27
3.2.3. Aufbewahrung der Milch- und Blutproben	29
3.2.4. Schalm-Test	29
3.2.5. Durchführung des Progesteron-Schnelltests in der Milch	29
3.2.6.1. Qualitätsüberprüfung des Enzygnost ^R -Testsystems	31

	Seite
3.2.6.2. Einflüsse von Zeit und Temperatur (+4° C und Zimmertemperatur) zwischen Testansatz und Auswertung auf die Ergebnisse des Enzygnost ^R - Tests	32
3.2.7. Progesteronbestimmung im Blutplasma und in der Milch mittels Radioimmunoassay	33
3.2.8. Blutprogesteronbestimmung mittels Schnelltests	33
3.2.9. Einfluß des MilCHFettes auf den Progesterongehalt	33
3.3. Feldversuch	34
3.3.1. Kontrolle des Besamungszeitpunktes	35
3.3.2. Progesteronbestimmung zur Erfassung des Zyklusverlaufs	36
3.3.3. Trächtigkeitsuntersuchung	36
3.4. Statistische Auswertung	36
4. ERGEBNISSE	37
4.1. Einflüsse der Art des Gemelkes (Vor-, Gesamt- und Nachgemelk) und des Intervalls zwischen Melken und Probenentnahme auf die Progesteronkonzentration in der Milch	37
4.2. Progesteronkonzentration im Blutplasma	41
4.3. Progesteronprofil im Zyklus (Bestimmung mit dem Enzygnost ^R Milchprogesteron-Schnelltest)	45
4.4. Das Progesteronprofil während der Frühgravidität	45
4.5. Vergleich der Progesteronprofile während des Zyklus und der Frühgravidität	48
4.6. Der Schwellenwert	48
4.7. Beurteilung des Enzygnost ^R -Schnelltests	50
4.7.1. Intraassay- und Interassay-Variationskoeffizient	50
4.7.2. Qualität der Antikörperbeschichtung	52
4.7.3. Prozentuale Abweichungen der Doppelbestimmungen	53

III

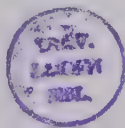
	Seite	
4.8.	Vergleich der Ergebnisse der Progesteronkonzentration in der Milch nach Bestimmung mit Enzygnost ^R Milch-Schnelltest, dem Hormonost ^R , dem Progestassay ^R , dem Reprostrip ^R und dem Radioimmunoassay	55
4.8.1.	Zuverlässigkeit der verschiedenen Tests	55
4.9.	Einfluß des Zellgehaltes der Vollmilch (Schalm-Test) auf die Progesteronkonzentration	60
4.10.	Kontrolle des Besamungszeitpunktes	62
4.11.	Kontrolle der Doppelbesamungen	69
4.12.	Besamung in der Gelbkörperphase	72
4.13.	Ovarialzysten: Erfassung der Gelbkörperneubildung nach Zystenbehandlung mit Hilfe der Progesteronbestimmung	79
4.14.	Brunstvorhersage	81
5.	DISKUSSION	82
5.1.	Vorversuch	82
5.2.	Feldversuch	89
6.	ZUSAMMENFASSUNG	96
7.	SUMMARY	99
	"Experiences with a rapid testkit for progesterone in insemination-programs for cattle"	
8.	LITERATURVERZEICHNIS	102

1. EINLEITUNG

Die Brunsterkennung in Milchviehbeständen ist für das Festsetzen des richtigen Besamungstermins von entscheidender Bedeutung. Zunehmende Rationalisierung in der Landwirtschaft und hohe Personalkosten haben dazu geführt, daß zu wenig Zeit für die Beobachtung des Einzeltieres eingesetzt und somit die Brunst oft übersehen wird. Außerdem hat die gesteigerte Milchproduktion bei nicht leistungsgerechter Versorgung negative Einflüsse auf die Brunsterscheinungen. Stille Brunst, Brunstlosigkeit sowie Ovarialzysten treten auf. Etwa 28% der brünstigen Kühe werden übersehen und bis zu 31% der Kühe im nichtbrünstigen Zeitraum besamt (LEIDL und VAUPEL, 1973; GÜNZLER et al., 1975; HOFFMANN et al., 1976; BULMAN und LAMMING, 1978).

"Falsche" Brunstbeobachtungen beeinträchtigen die Fruchtbarkeitslage eines Betriebes und können zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten führen. Die Zwischenkalbezeit kann sich bis auf über 400 Tage verlängern, die Nutzungsdauer der Tiere verkürzt sich und der Anteil an "Problemkühen" steigt.

Prinzipiell ist nicht nur das Feststellen der Brunst, sondern auch das Erkennen des Brunstbeginns und damit das Abschätzen des Ovulationszeitpunktes für eine erfolgversprechende Besamung notwendig. Erfahrungsgemäß führen Besamungen, die früher als 6 Stunden vor und später als 24 Stunden nach Brunstbeginn durchgeführt werden, zu erniedrigten Konzeptionsraten.



Der Tierarzt kann Untersuchungsmethoden anwenden, die es ihm ermöglichen, den Zyklusstand des Tieres zu objektivieren. Neben der rektalen Befunderhebung ist die Bestimmung der Progesteronkonzentration in der Milch oder im Blut ein weiteres Hilfsmittel. Dies hat den Vorteil, daß, in Ergänzung zur klinischen Untersuchung, Störungen der Fruchtbarkeit und deren Ursachen besser zu erkennen sind.

Inzwischen stehen für die tierärztliche Praxis mehrere Progesteron-Schnelltests zu Verfügung. Nachteilig erscheint dabei die Empfehlung, zur Progesteronbestimmung Nachgemelk zu verwenden, weil der Zeitpunkt der Probenentnahme durch den Tierarzt dadurch erheblich eingeschränkt wird.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die praktischen Anwendungsmöglichkeiten und die Aussagefähigkeit dieser Progesteron-Schnelltests zu überprüfen und abzuklären.

2. LITERATUR

2.1. Brunstzyklus beim Rind

Unter Brunstzyklus versteht man eine dem weiblichen Organismus eigene, durch neuroendokrine Mechanismen gesteuerte, regelmäßige zyklische Veränderung am Genitale und am psychosexuellen Verhalten, die letztlich der Fortpflanzung und der Arterhaltung dient (ARTHUR et al., 1982; ROBERTS, 1986).

Die Zyklusdauer beim Rind beträgt durchschnittlich 21 (18 - 24) Tage (ASDELL, 1964; JÖCHLE und LAMOND, 1980). 16 - 20% der Kühe zeigen eine Zyklusdauer von weniger als 18 oder mehr als 24 Tagen (SALISBURY et al., 1978; JÖCHLE und LAMOND, 1980). Nur bei 3% der Kühe ist die Zyklusdauer länger als 30 Tage und bei 4% kürzer als 14 Tage. Die Regelmäßigkeit der Zyklen bei ansonsten klinisch normal erscheinenden Kühen, steht im Zusammenhang mit hohen Konzeptionsraten (ASDELL, 1964; SCHAMS und BUTZ, 1972).

Prinzipiell läßt sich der Zyklusverlauf in 4 Phasen einteilen:

1. Proöstrus (18. bis 20. Zyklustag),
2. Östrus (Zyklustag 0),
3. Metöstrus (1. bis 4. Zyklustag) und
4. Diöstrus (5. bis 17. Zyklustag).

Die für Paarungsbereitschaft und Konzeptionstüchtigkeit entscheidende Östrusphase dauert 2 - 30 Stunden, im Durchschnitt 17 (14 - 18) Stunden (HANSEL, 1959; JÖCHLE und LAMOND, 1980). Die Ovulation erfolgt spontan 10 - 14 Stunden nach Abklingen der äußeren Brunstsymptome (JÖCHLE und LAMOND, 1980). Die Brunst bleibt üblicherweise bei einer Trächtigkeit aus, kann je-

doch während der Gravidität mit einer Häufigkeit von 2 - 6% auftreten (ARTHUR et al., 1982; ROBERTS, 1986). Bei sehr guter Versorgung und Brunstbeobachtung kann dieser Anteil bis auf 10% ansteigen (DONALD, 1943; DONOHO und RICKARD, 1955; ERB und MORRISON, 1958; SCHNEEBELI und EGGENBERGER, 1985).

Post-partum tritt die erste, an äußeren Merkmalen erkennbare Brunst nach OSCHMANN (1985) zwischen dem 10. - 20. Tag, nach MORROW et al. (1966), LÖVESTAD (1981) sowie nach THATCHER und WILCOX (1973) zwischen dem 20. und 60. Tag auf. Hormonanalytische Untersuchungen haben ergeben, daß der erste Zyklus post-partum meist verkürzt ist (OSCHMANN, 1985).

In einer Reihe klinischer Studien und Feldversuche konnte inzwischen belegt werden, daß zahlreiche Faktoren, wie zum Beispiel Klima, Haltung, Ernährung, Alter, Geburtsverlauf, Milchproduktion und hygienische Betreuung die Brunst beeinflussen können (LEIDL, 1963; LEIDL und VAUPEL, 1973; GORDON, 1983).

2.2. Ovarieller Zyklus

Progesteron nimmt bei der Regelung im Ablauf des Zyklus eine zentrale Stellung ein. Die Progesteronkonzentration im Blut und in der Milch, beide sind hoch miteinander korreliert, reflektiert die funktionellen Veränderung am Ovar (STABENFELDT et al., 1969; HOFFMANN, 1974; BAMBERG et al., 1975; WISE et al., 1982). Sie ist während des Östrus am niedrigsten und beträgt weniger als 0,5 ng

pro ml Blutplasma bzw. 5 ng/ml Vollmilch (HOFFMANN, 1977; PETERS und LAMMING, 1986). Die Progesteronkonzentrationen liegen an den folgenden 4 - 5 Zyklustagen im Blutplasma unter 0,5 ng/ml. Ab dem 5. Zyklustag beginnt die Gelbkörperphase. Die Progesteronwerte steigen zwischen dem 5. und 8. Tag langsam sowie zwischen dem 9. und 11. Tag schnell an. Höchste Progesteronwerte von 4,1 - 11,5 ng/ml Blutplasma bzw. 11 ng/ml Vollmilch werden zwischen dem 12. und 17. Zyklustag erreicht. Am 13. bis 14. Tag nach der Belegung sind die Progesteronwerte trächtiger Kühe signifikant höher als die nichtträchtiger Kühe (BRAUN, 1978). Durch individuelle und rassebedingte Schwankungen der Progesteronkonzentration, lassen sich diese Unterschiede nur erkennen, wenn bereits ein Progesteronprofil aus einem normalen Zyklus vorliegt (BRAUN, 1978; DIAZ et al., 1986). Ab dem 18. Tag sinkt die Progesteronkonzentration rasch ab und erreicht am 20. Zyklustag Werte um 0,5 ng/ml Blutplasma (BRAUN, 1978; RHODES et al., 1982).

Während des gesamten Zyklus reifen in mehreren Wellen Follikel heran (RAJAKOSKI, 1960; SCHNEEBELI und EGGENBERGER, 1985). Am 17. bis 18. Tag des Zyklus wachsen 1 - 2 Follikel stark an. Meist kommt jedoch nur einer zur Ovulation. Nach der Ovulation wird das Corpus luteum gebildet, das zwischen dem 3. und 6. Zyklustag sein intensivstes Wachstum aufweist (OKUDA et al., 1984). Ab dem 12. - 17. Zyklustag hat das Corpus luteum nur noch eine geringe Gewichtszunahme. Seine Regression findet in 2 Phasen statt: Für die 1. Phase ist der Abfall der Progesteronkonzentration um den 18. Zyklustag kennzeichnend und für die 2. Phase der Beginn der morphologischen Rückbildung. Erst 2 bis 3 Tage nach dem Progesteron-

ronabfall zeigt das Corpus luteum ein deutlich reduziertes Gewicht (HANSEL, 1981; OKUDA et al., 1984).

2.3. Entwicklung des Progesterontests

Zur Bestimmung des Progesterons kamen früher biologisch-chemisch-physikalische Verfahren zur Anwendung, die die grundsätzliche Funktion des Hormons aufgedeckt haben (MURPHY et al., 1963).

Nachdem YALOW und BERSON (1959) das Prinzip des Radioimmunoassays zur Bestimmung von Insulin im Blut des Menschen entwickelt hatten, haben MURPHY et al. (1963) dieses radioimmunologische Verfahren zur Messung von Steroidhormonen herangezogen. Da sich diese Methode als hochspezifisch, empfindlich und genau erwiesen hat, ist sie zu einem der bedeutendsten Nachweisverfahren geworden (GOWAN und ETCHES, 1979; KARG, 1985).

Eine besondere Bedeutung kommt dem Enzymimmunoassay (EIA) zu, da dieser Test aufgrund einer hohen Empfindlichkeit und Spezifität mit dem Radioimmunoassay vergleichbar ist und nicht mit radioaktivem Material arbeitet (VOLLER et al., 1978; ARNSTADT und SCHMIDT-ADAMOPOULOU, 1982; ARNSTADT, 1983; COLLINS, 1984).

Das Verfahrensprinzip entspricht dem des Radioimmunoassays. Nach Ablauf der immunologischen Reaktion wird die Enzymaktivität anhand der enzymatischen Reaktion eines geeigneten chromogenen Substrates (O-Phenylendiamin) in ein lichtabsorbierendes, photometrisch meßbares Produkt umgesetzt (NAKAO, 1980; ARNSTADT und

CLEERE, 1981; SAUER et al., 1982; NAKAO et al., 1983a; BLAKE und GOULD, 1984; STANLEY et al., 1985a). Die Enzymaktivität ist dann proportional der Lichtabsorption durch das in der Indikatorreaktion gebildete Produkt. Die Meßbarkeit der Enzymreaktion mittels Spektrophotometer oder die rein visuelle Beurteilung hängt von der Intensität der Farbreaktion ab (ARNSTADT und CLEERE, 1981; ARNSTADT et al., 1981; FANTL et al., 1981; NAKAO et al., 1982; JOHANNSSON et al., 1985).

Das Hauptproblem, einen hochempfindlichen Schnell-Enzymimmunoassay zu entwickeln, lag zunächst in der Messung geringer Mengen des markierten Enzyms. Aus diesem Grund wurde ein sogenanntes Verstärkersystem entwickelt, bei dem zusätzlich ein Katalysator eingesetzt wird, der das durch die Enzymaktivität entstandene Molekül ca. 500 mal in seiner Farbintensität verstärkt (GALFRE und MILSTEIN, 1981; FANTL et al., 1981; JOHANNSSON et al., 1985; STANLEY et al., 1985a).

Im Vergleich zum Radioimmunoassay sind einige Vorteile zu nennen: Die benötigte Laborausstattung ist weniger aufwendig (VAN DE WIEL und KOOPS, 1978; 1986). Dies ermöglicht die Testausführung in Routinelabors für die klinisch-chemische Diagnostik (VAN DE WIEL et al., 1982; ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT, 1985a). Die Handhabung des Enzymimmunoassays ist einfach, besonders mit den sogenannten Fertigpackungen (DREW, 1986; ELMORE, 1986a). Die Tests sind schnell durchführbar und die Ergebnisse können innerhalb von 10 Minuten bis 4 Stunden vorliegen (STANLEY et al., 1985b; EDDY und CLARK, 1987; ARNSTADT et al., 1987; WORSFOLD et al., 1987).

Die Variabilität der verfügbaren Marker erlaubt die Erarbeitung vieler Methoden (HOEDEMAKER et al., 1984) und die Möglichkeiten zur Automatisierung (FOULKES et al., 1982b; HRUSKA, 1984; WANG et al., 1984).

Nachteilig auf die Enzymimmunoassay-Praktikabilität wirkt sich der Einsatz von Enzymen, Peroxidase und deren Chromogenen aus, welche als mutagen und karzinogen gelten (VOOGD et al., 1980).

2.4. Progesteronbestimmung im Blut

Das Blut muß vorsichtig entnommen werden, da eine Zerstörung der Erythrozyten zu falschen Ergebnissen führen kann (HUNTER, 1978; DAVIES und FLETCHER, 1987). Heparin- oder EDTA-Zusätze sind für die Gewinnung von Blutplasma geeignet (SAUMANDE und FONTAINE, 1984). Das Progesteron im Plasma bzw. Serum wird beim Radioimmunoassay vor der immunologischen Reaktion mit n-Hexan, Petroläther oder n-Octan extrahiert (AXEN et al., 1967; HOFFMANN et al., 1973; HOFFMANN, 1977). Beim Enzymimmunoassay im Blut ist eine vorherige Progesteronextraktion nicht notwendig (EDDY und CLARK, 1987; DAVIES und FLETCHER, 1987). Ein anhand des RIA ermittelter Progesterongehalt von mehr als 1,0 ng/ml Blutplasma wird beim Rind als Anzeichen für ein endokrin aktives Corpus luteum gewertet (HOFFMANN und HAMBURGER, 1973). Die Grenze für ein endokrin aktives Corpus luteum liegt beim EIA mit 5,0 ng/ml Serum höher als beim Radioimmunoassay (DRAY et al., 1975; VAN DE WIEL und KOOPS, 1982; 1986; NAKAO et al., 1983b).

Die gerinnungshemmenden Zusätze, wie Zitrat, Heparin, Oxalat, u.ä., beeinflussen die Progesteronkonzentration nur geringfügig (EDQVIST und STABENFELDT, 1980; POPE und SWINBURNE, 1980).

2.5. Progesteronbestimmung in der Milch

Nachdem bekannt war, daß Progesteron vom Ovar über das Blut vermutlich auf dem Wege der Diffusion in die Milch gelangt (McCRA-CKEN, 1964; SHEMAH et al., 1968; HEAP et al., 1969; HOFFMANN und HAMBURGER, 1973) und zwischen dem Progesterongehalt im Blut und dem in der Milch eine gute Korrelation besteht ($r = 0,7$ bis $0,9$), wurden erste Versuche angestellt, die Zusammenhänge zwischen der Progesteronkonzentration in der Milch und den zyklischen Abläufen am Ovar aufzuzeigen (LAING und HEAP, 1971; HOFFMANN und HAMBURGER, 1973; DARLING et al., 1974; PENNINGTON et al., 1976). Minimalwerte wurden in der Milch wie auch im Blutplasma einheitlich zum Zeitpunkt der Ovulation gemessen. Die Progesteronwerte in der Milch sind für die Ermittlung des Zyklusverlaufs zuverlässiger als Blutprogesteronwerte. Dies ist dadurch zu erklären, daß der Progesterongehalt in der Milch einen Speicher von ca. 12 Stunden repräsentiert, während der Progesterongehalt im Blut nur eine Momentaufnahme wiedergibt (BULMAN und LAMMING, 1976; HOFFMANN et al., 1976; CAUDLE et al., 1980). HEAP und Mitarbeiter (1974) sowie GRUNERT und Mitarbeiter (1985) konnten anhand ihrer Untersuchungen aufzeigen, daß zwischen den Progesteronwerten in der Milch und den klinischen Befunden eine gute Korrelation ($r = 0,9$) besteht. Die Grenze für ein endokrin aktives Corpus

luteum beim Rind nach radioimmunologischer Bestimmung liegt bei 90 ng/ml Milchfett, 5,5 ng/ml Vollmilch bzw. 0,4 ng/ml Magermilch (HAMBURGER, 1974; GÜNZLER et al., 1979; CLAUS et al., 1983; MEYER et al., 1986)

Wegen der einfacheren Probenentnahme, wird die Bestimmung von Progesteron in der Milch vorgezogen. Da die Milchprobenentnahme leicht, das heißt, auch vom Tierbesitzer durchgeführt werden kann, wurde versucht insbesondere den Milchprogesteron-Schnelltest weiterzuentwickeln (JOYCE et al., 1981; ARNSTADT et al., 1982; STANLEY et al., 1985a; SAUER et al., 1986).

Die Bestimmung des Progesterons in der Milch warf, im Vergleich zum Blut, erhebliche zusätzliche Probleme auf. Zunächst stellten HOFFMANN und HAMBURGER (1973), HEAP et al. (1974) und POPE et al. (1976) fest, daß die Progesteronkonzentration in der Milch sehr eng mit dem Fettgehalt korreliert ist ($r = 0,9$). Nach HEAP et al. (1974) befindet sich das Progesteron zu 75% in der Fettphase der Milch, während die restlichen 25% an die Kaseinfraktion gebunden sind. Deshalb hatten HOFFMANN und Mitarbeiter (1977) und CLAUS und RATTENBERGER (1979) die Bestimmung von Progesteron im Milchfett und POPE et al. (1976), McCaughey und GORDON (1979) und MEYER et al. (1986) die Bestimmung von Progesteron in der Magermilch empfohlen, um Fehler durch Milchfettschwankungen zu vermeiden. Dagegen stellten PENNINGTON et al. (1976) und STANLEY et al. (1986) keine enge Beziehung zwischen Milchfettgehalt und Progesteronkonzentration fest.

Weiterhin wurde von zahlreichen Autoren die Frage nach der Abhängigkeit der Progesteronkonzentration von der Gemelkart aufgeworfen. Nach HOFFMANN und HAMBURGER (1973) und HOFFMANN et al. (1979) lag der Progesterongehalt im Vorgemelk (1,1% Fett; 3,45 ng/ml Vollmilch) niedriger als im Nachgemelk (14,6% MilCHFett; 10,0 ng/ml Vollmilch). Die Progesteronkonzentration des Vorgemelks ist auch niedriger als die des Hauptgemelks. Das Nachgemelk enthält die höchste Konzentration (SCHIAVO et al. 1975; McCaughy und GORDON, 1979; ABDEL-RAHIM et al., 1982). Darüber hinaus stellten HEAP et al. (1976) und BATRA et al. (1980) in der Milch, die morgens und nachmittags gewonnen wurde, Schwankungen der Progesteronkonzentration fest, wobei die Progesteronwerte am Morgen signifikant niedriger waren. GINTHER et al. (1976) fanden bei Proben zwischen morgendlichem Vor- und Nachgemelk eine zunehmende Progesteronkonzentration. Der Progesteronanstieg setzte sich am Nachmittag fort. Es wird allgemein angenommen, daß die Progesteronkonzentration morgens niedriger ist als nachmittags. Das Abendgemelk enthält die höchsten Werte (HOLDSWORTH et al., 1980; PENNINGTON et al., 1981).

Die Progesteronkonzentrationen in der Milch sollen nach Angaben einiger Autoren von der Rinderrasse unabhängig sein (RHODES et al., 1982; DIAZ et al., 1986). Die Progesteronbestimmungen in der Milch bekannter Rassen, wie zum Beispiel "Deutsches Fleckvieh" (CLAUS et al., 1985), French Friesian (THIBIER et al., 1976), British Friesian, Guernsey, Jersey (HEAP et al., 1973) und Büffel (KAMONPATANA et al., 1979; FEKRY und KLEEBOG-RUPPERT, 1985), führten zu ähnlichen Ergebnissen. In anderen Untersuchungen wurde jedoch eindeutig nachgewiesen, daß die Progesteronkonzentrationen

tration in der Milch der Kühe von der Rasse abhängig ist (BOOTH et al., 1979; DIAZ et al., 1986).

Das Euterviertel, aus dem die Milch entnommen wird, spielt für die Progesteronkonzentration keine Rolle (SCHIAVO et al., 1975; McCAUGHEY und GORDON, 1979). Nach PENNINGTON et al. (1981) wird die Progesteronkonzentration am meisten durch das Reproduktionsstadium beeinflusst, wobei während der Brunst die geringsten Schwankungen im Progesterongehalt auftreten. Das Stadium der Laktation erwies sich ohne Einfluß auf die Progesteronkonzentration. Die Nachweisgenauigkeit des Enzymimmunoassays, sowohl für die aus gesunden Vierteln gewonnenen Milchproben als auch für solche, die aus makroskopisch, klinisch, subklinisch oder latent infizierten Vierteln stammen, bleibt gleich (HOEDEMAKER, 1982; ANDERSON et al., 1983; HOEDEMAKER und GRUNERT, 1984; LAITINEN, 1986). Nur im Falle einer Staphylococcus aureus-Infektion kann die Nachweisgenauigkeit des Progesterons beeinträchtigt sein (FAYEMI et al., 1980; 1982). Infektionen mit anderen Staphylococcus-Arten, Bakterien und Viren haben dagegen keinen Einfluß auf die Progesteronkonzentration in der Milch (HOEDEMAKER und GRUNERT, 1984; LAITINEN, 1986).

DOBSON und Mitarbeiter (1975) sowie ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT (1985b) berichten beim Milchprogesteron-Test über eine Verfälschung der Eichkurve, die durch Konservierungsmittel, wie zum Beispiel Kaliumdichromat und Quecksilberchlorid, verursacht werden soll. In anderen Untersuchungen wurde jedoch nachgewiesen, daß Natriumazid (FOULVES et al., 1982a), Formalin (HEAP et al.,

1974), Queckersilberchlorid (ARNSTADT et al., 1982) sowie Kaliumdichromat (ALLEN et al., 1980; HOEDEMAKER und HELD, 1985) als Konservierungsmittel für die Milchprogesteronbestimmung geeignet sind.

Die Überprüfung verschiedener Lagerungsbedingungen der Milchproben für den Enzymimmunoassay bei Temperaturen zwischen -20°C und $+37^{\circ}\text{C}$ hat gezeigt, daß eine Lagerung von 8 bis 72 Stunden keinen Einfluß auf die Ergebnisse hat (ARNSTADT et al., 1982; STANLEY et al., 1986). Ebenso stellten YASUHARA und KLEEBOERG-RUPPERT (1984) fest, daß weder eine Homogenisierung von 5 bis 20 Sekunden, noch die Lagerung bei -20°C bis $+37^{\circ}\text{C}$ einen Einfluß auf die Ergebnisse hatten.

POPE und SWINBURNE (1980) fordern eine Vereinheitlichung der Probenentnahme, um Variationen, die durch unterschiedliche Gemelke (Vor-, Haupt-, Nach- und Gesamtgemelk) bedingt sind, vermeiden zu können. Eine solche "Standardisierung" würde die Anwendung von Nachgemelksproben, die sorgfältige Durchmischung der Vollmilch, um die Fettkügelchen homogen zu verteilen und die Durchführung der Probenentnahme immer zum gleichen Zeitpunkt oder ähnlichen Bedingungen erfordern.

2.6. Die Anwendung des Milchprogesteron-Schnelltests

Der Gedanke von SHEMESH et al. (1968), die Progesteronbestimmung für die Kontrolle des Reproduktionszyklus einzusetzen, eröffnete

eine neue Möglichkeit der Diagnostik bei der Überwachung und Steuerung der Fortpflanzung. Die Anwendungsmöglichkeiten der verschiedenen Progesterontests, wie sie in der Praxis Einsatz finden können, hängen von der Genauigkeit, der Empfindlichkeit, der Praktikabilität und der Aussagefähigkeit der jeweiligen Tests in Zusammenhang mit den bestehenden Ansprüchen, den Gemelksfraktionen und den lokalen Gegebenheiten ab. Zum Beispiel ist die Arbeit mit dem Enzymimmunoassay (EIA) einfacher als mit dem Radioimmunoassay (VAN DE WIEL et al., 1982). Geht es lediglich darum, eine Gelbkörperfunktion nachzuweisen, so genügt die einfache Aussage mit den geringsten Ansprüchen an die Qualität des Nachweisverfahrens (HEAP et al., 1976; BULMAN und LAMMING, 1978; PENNINGTON et al., 1981). Derartige "Ja/Nein"-Aussagen können für die Brunstüberwachung und den Trächtigkeitsnachweis eingesetzt werden. Für diese Indikationen sind alle Methoden geeignet (RATTENBERGER, 1985; ELMORE, 1986a; ARNSTADT et al., 1987).

Eine völlig andere Situation liegt vor, wenn zwischen Basisprogesteronwerten zum Zeitpunkt der Ovulation und den Progesteronwerten einer beginnenden Gelbkörperaktivität differenziert werden soll, wie zum Beispiel beim Anstieg der Progesteronkonzentration bis zum 5. Tag nach dem Östrus (Östrus = Tag 0) oder beim Abfall bzw. Ende der Gelbkörperphase (2. bis 3. Tag vor dem Östrus; RATTENBERGER und GÜNZLER, 1979; RATTENBERGER, 1985). Diesen Anforderungen genügen der Radioimmunoassay in Blut, Vollmilch, Magermilch oder Milchfett und der photometrisch auswertbare Enzymimmunoassay in Blut oder Vollmilch (GÜNZLER et al., 1979; CLAUS et al., 1982; 1983; GÜNZLER et al., 1982; HRUSKA und VERZNIK,

1983; RATTENBERGER, 1985; SAUER et al., 1986; VAN DE WIEL und KOOPS, 1986).

Die höchste Genauigkeit ist für die sogenannte "Tag 0/1" Probenkombination erforderlich, bei welcher eine individuelle Differenzierung der Progesteronwerte im Basisbereich helfen soll, den Besamungszeitpunkt zu optimieren. Die Genauigkeit, die ein "0/1-Test" fordert, ist bisher nur mit einer radioimmunologischen Bestimmung im MilCHFett zu erzielen (CLAUS et al., 1982; 1985; HAUG und CLAUS, 1983; HOCKE und HAHN, 1983).

Für den praktischen Einsatz der Milchprogesterontests sind grundsätzlich auch der Gesamtzeitbedarf für die Bestimmung sowie die Investitions-, Material- und Personalkosten der verschiedenen Tests zu berücksichtigen. Der Nachweis im MilCHFett setzt voraus, daß ein zusätzlicher Laborschritt, die Fettabtrennung, durchgeführt wird, der zur Verlängerung des Zeitaufwandes führt. Der Radioimmunoassay mit Tritiummarkierung ist für die Praxis aufgrund des Umgangs mit radioaktiven Materialien und der relativ langen Testdauer nur bedingt geeignet (RATTENBERGER, 1985).

Der routinemäßige Einsatz des klassischen Enzymimmunoassays stößt wegen des hohen Zeitaufwandes und der mangelnden Genauigkeit immer noch auf gewisse Schwierigkeiten (RATTENBERGER, 1985). Mit den Mikrotiterplatten-Progesteron-Schnelltests, kann durch Verwendung monoklonaler Antikörper und verbesserter Enzymreaktionen eine dem Radioimmunoassay entsprechende hohe Empfindlichkeit erreicht werden (GALFRE und MILSTEIN, 1981; ELLIS et al., 1986;

STANLEY et al., 1986). Diese Schnelltests, die ohne große Ausstattung durchgeführt werden können, bieten dem praktizierenden Tierarzt eine rasche, objektive Einschätzung der Progesteronkonzentration und damit eine Erweiterung seiner diagnostischen Möglichkeiten (HOLTZ et al., 1986).

2.6.1. Brunsterkennung

Die Schwellenwerte für endokrin aktive Corpora lutea sind vom Testverfahren abhängig (Tab. 1). Setzt ein Abfall der Progesteronkonzentration unter den Schwellenwert ein, so ist eine Brunst innerhalb von 24 bis 36 Stunden zu erwarten (KARG, 1981; REIMERS et al., 1981; HEINONEN et al., 1982). Die Progesteronkonzentration bleibt bis zu 8 Tage unter dem Schwellenwert (EDQVIST und STABENFELDT, 1980; STANLEY et al., 1986). In der Regel werden die Milchproben am Tag der Besamung (Tag 0) entnommen (HOFFMANN et al., 1976; ARNSTADT et al., 1981). Liegt die Progesteronkonzentration am Tag der Besamung (Tag 0) unter dem Schwellenwert, so wird angenommen, daß sich die Kuh in der Brunstphase befindet. Diese Annahme trifft jedoch nur in etwa 85% der Fälle zu, da eine niedrige Progesteronkonzentration auch vor und nach der Brunst, bei Anöstrie, Follikel-Theka-Zysten und ähnlichen Ursachen auftreten kann (BAMBERG et al., 1981; HOEDEMAKER et al., 1984; BARTH et al., 1986).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin an den Tagen 0, 1 und 7 eine Milchprobe zu entnehmen, um den Eisprung und die Gelbkör-

Tab. 1: Progesteronkonzentration (ng/ml) in verschiedenen Fraktionen der Milch zur Differenzierung zwischen endokrin aktiven und nichtaktiven Corpora lutea

Substrat (Gemelk)	Test/ Methode	Zyklusstadium		Gravidität Tag 20-24	Autor
		Tag 0	Tag 5-7		
Milchfett	RIA	≤30,0	30,0 - 90,0	>90,0	GÜNZLER et al., 1979
Magermilch	RIA	≤ 0,4	0,4 - 1,0	> 1,0	POPE et al., 1976
	EIA*	≤ 0,5	0,5 - 1,5	> 1,5	MEYER et al., 1986
Vorgemelk	RIA	≤ 2,0	2,0 - 5,0	> 5,0	GIMTHER et al., 1976
	EIA*	≤ 5,0	5,0 - 10,0	> 10,0	EDDY und CLARK, 1987
Hauptgemelk	RIA	≤ 2,0	2,0 - 11,0	> 11,0	HOFFMANN et al., 1974
	EIA*	≤ 5,0	5,0 - 10,0	> 10,0	STANLEY et al., 1986
Nachgemelk	RIA	≤ 2,0	2,0 - 11,0	> 11,0	HOFFMANN et al., 1974
	EIA*	≤ 5,0	5,0 - 10,0	> 10,0	CLAUS et al., 1985
Gesamtgemelk	RIA	≤ 2,0	2,0 - 11,0	> 11,0	HOFFMANN et al., 1976
	EIA*	≤ 5,0	5,0 - 10,0	> 10,0	HOLTZ et al., 1986

* Enzymimmunoassay auf Mikrotiterplatten

perentwicklung zu bestätigen (ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT, 1985a). Findet während des Brunstzeitraumes ein weiterer Progesteronabfall vom Tag der Besamung (Tag 0) zum folgenden Tag (Tag 1) statt, war die Besamung zu früh (KÖRBER, 1985; KÖRBER et al., 1986). Findet dagegen während des Brunstzeitraumes ein Progesteronanstieg von Tag 0 auf Tag 1 statt, lag die Besamung zu spät (KÖRBER et al., 1986). Ein Abfall der Progesteronkonzentration von Tag 0 zu Tag 1 um mehr als 4 ng/ml Milchfett soll mit einer erheblichen Senkung der Trächtigkeitsrate verbunden sein. Bleibt die Progesteronkonzentration am Tag 0 und Tag 7 niedriger als die Schwellenwerte, hatte die Kuh nach RATTENBERGER (1985) eine sogenannte anovulatorische Brunst. Diese Ansicht ist jedoch sicher

nur für einen Teil dieser Fälle zutreffend, weil auch verschiedene andere Störungen zu ähnlichen Progesteronwerten führen können. Liegt die Progesteronkonzentration am Tag 7 über den Schwellenwerten, hat eine Ovulation stattgefunden; ist sie zwischen der niedrigsten Konzentration am Tag 0 und der höchsten Konzentration am Tag 7, so weisen diese Werte vermutlich auf Zyklusstörungen, wie zum Beispiel verlängerten Zyklus, verzögerte Ovulation oder Gelbkörpersubfunktion hin (SPECKER, 1980; ARTHUR et al., 1982; KÖRBER et al., 1986). Generell ist darauf hinzuweisen, daß die Umsetzung von 1 bis 2 Progesteronbestimmungen in klinische Befunde oder Diagnosen stets mit Vorbehalt zu sehen ist. Die Progesteronwerte sind als vorzügliche diagnostische Hilfsmittel einzustufen. In Kombination mit klinischen Befunden führen sie zu fundierten Erkenntnissen.

Durch den Milchprogesterontest ist es möglich, bis zu 31% der Besamungen bei Kühen, die sich in der Lutealphase befinden, zu vermeiden (BALL et al., 1980; CLAUS und HAUG, 1984; CAVESTANY und FOOTE, 1985). Der Einsatz des Milchprogesterontests ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn ein exakter Vorbericht über das Zyklusgeschehen des Tieres vorliegt (FOOTE, 1975; APPELYARD und COOK, 1976). Die physiologische Zeitspanne der minimalen Progesteronkonzentration beträgt ca. 3 bis 8 Tage, das heißt, der exakte Brunstzeitraum mit einer Dauer von ca. 14 bis 18 Stunden ist mit einer Einzelmilchprobe nicht erfaßbar. Der Progesterontest kann deshalb nur zu der eindeutigen Aussage "nichtträchtig" oder "nichtbrünstig" führen. Seine Bezeichnung als "Brunsttest" ist irreführend.

2.6.2. Trächtigkeitsnachweis

Die Frühgraviditätsdiagnose anhand der Bestimmung der Progesteronkonzentration basiert auf der Tatsache, daß im Falle einer Konzeption ein hoher Progesteronspiegel im Blutplasma oder in der Milch frühzeitig (13. - 14. Tag nach der Besamung) ein aktives Corpus luteum graviditatis anzeigt (HAMBURGER, 1974; BRAUN, 1978; CHANG und ESTERGREEN, 1983). Anstelle eines Abfalls am 18. Tag nach der Besamung bleibt bei einer Gravidität die Progesteronkonzentration hoch (SHEMESH et al., 1973). Die Milchproben werden vom 20. bis 24. Tag nach der Besamung genommen (HEAP et al., 1973; HOFFMANN et al., 1974; SHELFORD et al., 1979; INAUDI et al., 1982; NAKAO et al., 1982). Unter Berücksichtigung der Schwellenwerte für ein endokrin aktives bzw. nichtaktives Corpus luteum (Tab. 1) kann früh ermittelt werden, ob eine Kuh trächtig sein kann oder nicht-trächtig ist.

Die Sicherheit des Progesterontests wurde durch rektale Untersuchungen 8 bis 10 Wochen nach der Besamung überprüft (HEAP et al., 1973). Die Aussagekraft des Milchprogesterontests beträgt zwischen dem 20. und 24. Tag nach der Besamung etwa 60 bis 95% (im Durchschnitt 81%) bei positivem Ergebnis, 90 bis 100% (im Durchschnitt 95%) bei negativem Ergebnis (BOOTH et al., 1979; EASTMANN, 1979; CHANG und ESTERGREEN, 1984; DÜBELI und ZEROBIN, 1984; PENNINGTON et al., 1985). Die Schwankungsbreite dieser Angaben ist durch die unterschiedliche Wahl der Progesteronschwellenwerte sowie durch embryonalen Fruchttod, Resorption der Frucht, Ovarialzysten, verlängerte bzw. verkürzte Zyklusinterval-

le, Genitalkatarrhe, persistierende Corpora lutea, Belegung der Tiere zum falschen Zeitpunkt, falsche Führung des Stallbuches usw., zu erklären (BULMAN und LAMMING, 1979; GÜNZLER et al., 1982).

2.6.3. Kontrolle von Fertilitätsstörungen

Eine Progesteronbestimmung in der Milch kann zur Kontrolle des ovariellen Zyklus von Milchkühen verwendet werden (KOZICKI et al., 1982; GRUNERT et al., 1985). Bei bestimmten Fragestellungen, wie zum Beispiel Anlaufen des Zyklus post-partum, verzögerter Ovulation, Besamung in der Lutealphase, Ovarialzysten, Aborten oder Stillbrünstigkeit, kann der Milchprogesterontest wertvolle Hinweise liefern (COX et al., 1978; BULMAN und LAMMING, 1978; MATHER et al., 1978; LÖVESTAD, 1981; SCHILLING et al., 1982; KOPPINEN et al., 1984; ROY et al., 1985).

Um zu erkennen, wann nach dem Kalben die erste normale Brunst auftritt und welche Problemtiere an Fertilitätsstörungen leiden, werden ca. ab dem 30. Tag post-partum Milchproben für 3 bis 4 Wochen im Abstand von 3 bis 7 Tagen entnommen. Liefert die Progesteronbestimmung Hinweise für einen Zyklus kann die erste Brunst erfaßt und die Besamung veranlaßt werden. Obwohl nach VAN DE WIEL et al. (1979) und OSCHMANN (1985) die erste Ovaritätätigkeit bei 88% der untersuchten Tiere schon vor dem 30. Tag post-partum zu erkennen war, zeigen nur 36% der Tiere die erste Brunst in dieser Zeit (MATHER et al., 1978; HIMSTEDT et al., 1984).

In der Praxis sollen ca. 20% bis 40% aller Kühe stillbrünstig sein (ARTHUR et al., 1982; ROBERTS, 1986). Auch diese Kühe weisen während der Brunstphase eine Progesteronkonzentration auf, die unter dem Schwellenwert liegt. In solchen Fällen hat es sich bewährt, jeden 2. oder 3. Tag vor der erwarteten Brunst Milchproben zu entnehmen. Da mit der Brunst 24 bis 36 Stunden nach dem plötzlichen Absinken des Progesteronwertes gerechnet wird, kann die Kuh mit oder ohne Bestätigung der Brunstsymptome zum richtigen Zeitpunkt besamt werden (LAMMING und BULMAN, 1976; ARTHUR et al., 1982). Auf die zuchthygienischen Aspekte einer derartigen Maßnahme wird in diesem Zusammenhang nicht eingegangen.

2.6.4. Absicherung und Kontrolle therapeutischer Maßnahmen

Mit dem Milchprogesterontest kann zwischen endokrin aktivem und nichtaktivem Gelbkörpergewebe unterschieden werden (MATHER et al., 1978; ROY et al., 1985). Diese Differenzierung ist anhand rektaler Untersuchungen nicht sicher möglich und besonders schwierig bei Tieren, die zum Beispiel schwer palpierbare Gelbkörper haben oder deren Gelbkörper sich im beginnenden Regressionsstadium befindet (IRVIN et al., 1978; STOLLA und HIMMER, 1980; VALE-FILHO et al., 1986). GODKE et al. (1979) selektierten anhand von Progesterontests die Kühe zur Behandlung mit Prostaglandinen. Auch LEIDL et al. (1977) und GRUNERT et al. (1985) kontrollierten die Behandlung mit Prostaglandinen anhand von Progesterontests.

Der Progesterontest kann zur Kontrolle für den Erfolg einer medikamentell induzierten Brunst angewendet werden (HOAGLAND und BARNES, 1984; SCHALLENBERGER et al., 1984). Der Test zeigt unter Umständen falsche klinische Diagnosestellungen auf (DOBSON und FITZPATRICK, 1976; HIMSTEDT et al., 1984; GRUNERT et al., 1985).

2.6.5. Embryotransfer

Der Progesterontest kann im Rahmen des Embryotransfers eingesetzt werden (HASLER et al., 1980; REMSEN und ROUSSEL, 1982; PETHES et al., 1983; MARKETTE et al., 1985). Er ist besonders zur Kontrolle von Superovulation und Besamungszeitpunkt geeignet. Viele Faktoren beeinflussen die Reaktion von Spenderkühen auf die Hormonapplikation zur Superovulation. Der Zyklusstand des Spenders ist dabei von essentieller Bedeutung. Beste Ergebnisse sind zu erwarten, wenn die Superovulation am 9. - 14. Zyklustag eingeleitet wird, und besonders bei Kühen, die innerhalb von 4 Tagen nach Prostaglandinverabreichung einen Progesteronabfall auf basale Werte zeigen (FOOTE et al., 1982; SAUMANDE et al., 1985).

Keine Beziehung besteht jedoch zwischen der Progesteronkonzentration und der Embryovitalität (TAMBOURA et al., 1985). ORDONEZ et al. (1982) fanden, daß der Progesterontest bei Empfängerkühen keine zusätzlichen Informationen über ihre Transfertauglichkeit geben kann, wenn die Kühe vorher gründlich klinisch untersucht wurden.

3. MATERIAL UND METHODEN

Die Fragestellung für die vorliegenden Untersuchungen war, Anwendungsmöglichkeiten und Aussagefähigkeiten der verschiedenen Progesteronschnelltests beim Rind unter Praxisbedingungen zu überprüfen. Kriterien, wie Anzahl der Laktationen, Postpartum-Intervall und Fütterung blieben unberücksichtigt. Die Untersuchungen wurden in Vorversuch und Feldversuch gegliedert.

3.1. Materialien, Geräte und Reagenzien

Für die Progesteronbestimmung mit Enzymimmuno-Schnelltests wurden folgende Testkits eingesetzt:

- (1) **Enzygnost^R** Milch-Progesteron Vet
- (2) **Enzygnost^R** Serum-Progesteron Vet

Diese ELISA ("Enzyme linked immunosorbent assay") Testkits (Fa. Hoechst, München) enthalten:

- (a) 96 Kavitäten (Polystyroltestplatte) beschichtet mit monoklonalen Antikörpern (Maus IgG), aufgeteilt in sechs herausnehmbare Riegel mit jeweils 8 x 2 Reaktionsvertiefungen in einem Plastikrahmen
- (b) 1,5 ml "Nullstandard", mit Kaliumdichromat konservierte Rindermilch für den Milch-Test oder Natriumazid konserviertes Serum für den Serum-Test (die Steroide wurden extrahiert)
- (c) 4 lyophilisierte Standards (nach Auflösen mit je 200 µl Milch-"Nullstandard" ergeben sich Konzentrationen von 1, 5, 10 und 30 ng Progesteron/ml Vollmilch bzw. mit je 500 µl

Serum-"Nullstandard" 10, 5, 2,5 und 1 ng/ml Serum)

- (d) Substrat im aufgelösten Zustand mit 0,2 nmol Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat in 0,09 nmol Diethanolamin
- (e) Verstärker im aufgelösten Zustand mit Alkoholdehydrogenase, Lipoamid-Dehydrogenase, Ethanol und Jodonitrotetrazolium-violett in Phosphatpuffer (pH 7,2)
- (f) Waschlösung-Konzentrat und
- (g) 12 ml Stopp-Lösung (0,2 molare Schwefelsäure).

Für die Schnelltests wurden zusätzlich zu diesen Reagenzien benötigt:

- 20 ml Röhrchen
- Schüttelwasserbad
- Einmal-Mikropipetten (20, 100, 200, 500 µl)
- Eppendorf Multipette 4780^R (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Meßzylinder (250 ml) aus Glas
- Schüttler (Vortex-Genie, Fa. Bender & Hobein, Zürich)
- Plastikwaschflasche (250 ml)
- Standardphotometer PCP 6121 (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- MR 700 Mikrotiterplattenphotometer (Fa. Dynatech GmbH, Frankfurt) mit programmierbarer linearer und semilogarithmischer Auswertung.

(3) **Progestassay**^R Milchprogesterone ELISA Testkit (Fa. Janssen GmbH, Neuss) enthält:

- (a) 40 "Dipsticks" mit monoklonalen Antikörpern beschichtet
- (b) Progesteron-Peroxidase-Konjugat-Konzentrat (0,5 ml)
- (c) Verdünnungsmittel zur Herstellung des Progesteronkonjugats

- (d) Waschlösung (90 ml)
- (e) Puffersubstrat (45 ml)
- (f) Substrat-Chromogen (10,5 ml)
- (g) Standards aus "Brunstmilchkontrolle" (10,5 ml) und "Trächtigkeitsmilchkontrolle" (10,5 ml)
- (h) eine Pipettierspritze
- (i) ca. 50 Pipettierspitzen.

Zusätzlich wurden benötigt:

- Reagenzglas-Ständer und 64 Röhrchen (ca. 7 ml) aus Glas:

- (4) **Reprostrip**^R Progesteron ELISA Schnelltest (Fa. Epignost Gesellschaft mbH, Linz) enthält:
 - (a) ca. 40 Pipetten
 - (b) 3 Gummihütchen (Pipettierhilfe)
 - (c) Waschlösung
 - (d) 4 Riegel mit je 8 Reaktionsvertiefungen; diese sind Antikörper-beschichtet und mit einer Konservierungslösung gefüllt
 - (e) Pufferlösung
 - (f) Chromogenlösung
 - (g) Substrat
 - (h) Standards aus 2,5 ng/ml "Brunstmilchkontrolle" und 10,5 ng/ml "Trächtigkeitsmilchkontrolle"
 - (i) 1 leeres Fläschchen zum Mischen der Farbreagenzien.

- (5) **Hormonost**^R Progesteron EIA (Fa. Biolab, München)

Diese Testkits enthalten:

- (a) Antikörper (100 ml)
- (b) Marker

(c) Substrat Tabletten

(d) Stop-Lösung

(e) Standards aus Rindermilch (0, 1, 5, 10, 30 ng/ml).

Zusätzlich zu diesen Reagenzien wurden benötigt:

- Röhrchen (12 x 100 mm) aus Glas
- Eiswasserbad
- Schüttelwasserbad
- Zentrifuge "Labofuge^R 6000" (Fa. Heraeus Christ, Osterode)
- Standard Photometer PCP 6121 (Fa. Eppendorf, Hamburg).

3.2. Vorversuch

3.2.1. Einfluß der Art des Gemelkes und des Intervalls zwischen Melkzeit und Probenentnahme auf die Progesteronkonzentration

Um den Einfluß des Intervalls zwischen Melkzeit und Probenentnahme sowie der Art des Gemelkes (Vor-, Gesamt- und Nachgemelk) auf die Progesteronkonzentration zu erfassen, wurden von Februar 1986 bis Juni 1986 8 Kühe der Rasse Deutsches Fleckvieh im Alter von 2 bis 6 Jahren untersucht. Der Reproduktionsstatus - Diöstrus (12. - 15. Zyklustag; Gruppe I: n = 3), Azyklie (Gruppe II: n = 2) und Trächtigkeit (3. Monat, Gruppe III: n = 3) - wurde durch die klinischen Befunde, einschließlich einer rektalen Untersuchung, bestätigt. Viertelgemelksproben (ca. 20 ml) wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen gewonnen. Vor-, Gesamt- und Nachgemelk wurden morgens und abends während der üblichen Melkzeiten entnommen.

Zusätzlich wurde Vorgemelk alternierend von jeder Kuh täglich einmal 3, 6 oder 9 Stunden nach Beendigung des Morgenmelkens entnommen (Tab. 2). Außerdem wurden Blutproben von jeder Kuh morgens und abends während der Melkzeit aus der Vena jugularis in ein heparinpräpariertes Röhrchen gewonnen.

3.2.2. Einfluß des Zellgehaltes der Vollmilch (Schalm-Test) auf die Progesteronkonzentration

An 39 Schwarzbunten Kühen unterschiedlichen Alters wurden Untersuchungen über den Einfluß des Zellgehaltes der Vollmilch auf die Aussagefähigkeit der Milchprogesteron-Schnelltests durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden nur solche Kühe ausgewählt, die auf einem Euterviertel klinisch gesund waren und einen negativen Schalm-Test hatten sowie auf einem anderen Viertel eine Mastitis bzw. einen Zellgehalt von 3+ im Schalm-Test (mehr als 5.000.000 Zellen/ml Vollmilch) aufwiesen. Die meisten Kühe waren bereits vom jeweiligen Hoftierarzt auf Mastitis sowie erhöhten Zellgehalt voruntersucht. Vor der Milchprobenentnahme wurde das Euter gereinigt, eine Desinfektion vorgenommen und abgetrocknet. Die ersten Milchstrahlen wurden verworfen. Die MilCHFettbestimmung nach dem GERBER-Verfahren und die Milcheiweißmessung nach dem KJELDAHL-Verfahren (HAUKE, 1965) wurden vom MilchprüfRing Bayern e.V. München (Untersuchungsstelle: Troppauerstraße 10) durchgeführt. Die bakteriologische Untersuchung erfolgte in der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik München.

Tab. 2: Schema der Milchprobenentnahme (+) zur methodischen Überprüfung von Progesteron-Schnelltests

Gruppe	Tag der Probenentnahme	Kuh	Uhrzeit				
			4*	7**	10**	13**	15*
I***	1	A	+	+			+
		B	+		+		+
		C	+			+	+
	2	A	+		+		+
		B	+			+	+
		C	+	+			+
	3	A	+			+	+
		B	+	+			+
		C	+		+		+
II***	1	D	+	+			+
		E	+		+		+
	2	D	+		+		+
		E	+			+	+
	3	D	+			+	+
		E	+	+			+
III***	1		7*	10**	13**	16**	17*
		F	+	+			+
		G	+		+		+
		H	+			+	+
	2	F	+			+	+
		G	+	+			+
		H	+		+		+
	3	F	+		+		+
		G	+			+	+
		H	+	+			+

* = Entnahme von Vor-, Gesamt- und Nachgemelk

** = Entnahme von Vorgemelk

*** = Gruppen: I = Kühe im Diöstrus, II = Azyklische Kühe und
III = Kühe im 3. Trächtigkeitsmonat

3.2.3. Aufbewahrung der Milch- und Blutproben

Für die MilCHFettbestimmung wurden die Milchproben unter Zusatz eines Konservierungsmittels (100 mg Natriumazid auf 35 ml Vollmilch) bei +4° C, für die Progesteronbestimmung wurden sie ohne Konservierungsmittel bei -18° C gelagert. Das Blutplasma wurde nach Zentrifugieren der Proben in heparinisierte Röhrchen bei +4° C und 1500 g (15 Minuten) abpipettiert und bis zur Progesteronbestimmung ebenfalls bei -18° C aufbewahrt.

3.2.4. Schalm-Test

Bei allen Milchproben wurde eine makroskopische Beurteilung des Sekrets anhand des Schalm-Tests (Tab. 3) durchgeführt (SCHALM, 1960).

3.2.5. Durchführung des Progesteron-Schnelltests in der Milch

Die bei -18° C gelagerten Milchproben wurden in einem Schüttelwasserbad (ca. +25° C) aufgetaut. Die Proben wurden jeweils 6 Sekunden gründlich mit einem Vortex-Schüttler gemischt. Die Progesteronbestimmung in der Vollmilch im Doppelansatz (Enzygnost^R, Hormonost^R) bzw. Einzelansatz (Progestassay^R, Reprostrip^R) erfolgte ohne vorherige Extraktion unter Berücksichtigung der mitgelieferten Arbeitsvorschriften. Die Farbintensität der Proben wurde mit der Farbintensität der Standards visuell, d.h. subjektiv

Tab. 3: Auswertung des Schalm-Tests

Abkürzung	Bedeutung/Interpretation
-	= negativ: Sekret makroskopisch unverändert, normale Milch bei laktierendem Euter; entspricht einem Zellgehalt von weniger als 200.000 Zellen/ml Sekret, polymorphkernige Leukozyten (PMN) 0 - 25%
±	= zweifelhaft: Milchcharakter erhalten, leicht veränderte Konsistenz; entspricht einem Zellgehalt von 150.000 - 550.000 Zellen/ml Sekret, PMN 30 - 40%
1	= schwach positiv: Milchcharakter leicht verloren, wäßrige Konsistenz ohne Flocken, leichte Schlierenbildung, keine Tendenz zur Gelbildung, Reaktion auch reversibel; entspricht einem Zellgehalt von etwa 400.000 - 1.500.000 Zellen/ml Sekret, PMN 40 - 60%
2	= deutlich positiv: Milchcharakter mäßig verloren, geringe Gelbildung; entspricht einem Zellgehalt von 800.000 - 5.000.000 Zellen/ml Sekret, PMN 60 - 70%
3	= stark positiv: Milchcharakter weitgehend verloren, starke Gelbildung; Zellgehalt von über 5.000.000 Zellen/ml Sekret, PMN 70 - 80%
pH +	= alkalische Milch pH-Wert 7,0 oder darüber, weist auf eine Herabsetzung der sekretorischen Aktivität der Drüse hin
pH S	= saure Milch, zeigt an, daß laktoseabbauende Bakterien in der Milchdrüse vorhanden sind

nach SCHALM (1960).

tiv ohne Photometer verglichen. Die mit dem Hormonost^R Progesteron-EIA-Test angesetzten Proben wurden mit einem Standardspektrophotometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) gemessen, die mit Enzygnost^R angesetzten Proben mit einem Mikrotiterplattenphotometer (Fa. Dynatech, Frankfurt). Danach wurden die Enzygnost^R- Proben (ca. 300 µl) aus den Testfeldern in Mikroküvetten überführt und visuell, blind (verdeckt) abgelesen. Anschließend wurde jede Probe mit 400 µl bidestilliertem Wasser verdünnt und mit einem Standardphotometer bei 492 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve, bestehend aus fünf Standardwerten (0, 1, 5, 10, 30 ng/ml Vollmilch), konnte die Progesteronkonzentration der Proben in ng/ml Vollmilch abgelesen werden.

Alle Milchproben, auch diejenigen aus dem Feldversuch, wurden nach der Durchführung des Schnelltests bei -18° C gelagert, um später die Progesteronbestimmung mit Hilfe eines Radioimmunoassay durchzuführen.

3.2.6.1. Qualitätsüberprüfung des Enzygnost^R-Testsystems

Um die "Wiederholbarkeit" zu ermitteln, wurden vier Proben (zwei Doppelbestimmungen von einer Probe mit hoher Konzentration und einer mit niedriger Konzentration) bei jedem Test mitbestimmt. Die Intraassay- und Interassay-Variationskoeffizienten und die durchschnittliche Abweichung der Doppelbestimmung wurden zur Qualitätsüberprüfung verwendet.

Zur Überprüfung der Variabilität der Antikörperbeschichtung auf

den Mikrotiterplatten wurden auf 10 gleichmäßig über die Platte verteilte Testfelder anstatt Milch 100 µl Progesteron-Alkalische-Phosphatase-Konjugat eingegeben. Es kam zu einer maximalen Bindung des enzymmarkierten Progesterons an die auf der Platte fixierten Antikörper. Ein Vergleich der Extinktion der einzelnen Streifen sollte Aufschluß über die Variabilität der Antikörperbeschichtung geben.

Der Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltest ist zum Progesteronnachweis in Rindermilch, der Enzygnost^R Serum-Schnelltest zum Progesteronnachweis in Serum bzw. Plasma aus Rinderblut bestimmt. Ob in der Praxis gleichzeitig Blut- und Milchproben in einem Ansatz unter Verwendung einer gemeinsamen Standardkurve eingesetzt werden können, wurde überprüft. "Nullstandards" aus konservierter Rindermilch oder konserviertem Pferdeserum wurden zur Bestimmung sowohl von Milch- als auch von Plasmaproben verwendet. Die Ergebnisse der zwei Standardkurven wurden verglichen.

3.2.6.2. Einflüsse von Zeit und Temperatur (+4° C und Zimmertemperatur) zwischen Testansatz und Auswertung auf die Ergebnisse des Enzygnost^R-Tests

Es sollte durch den Vergleich mit der Originalmessung herausgefunden werden, wie lange nach Beendigung des Testansatzes die fertige Platte ablesbar bleibt. Die Nachmessungen erfolgten im Abstand von 2, 6, 12, 36 und 48 Stunden.

3.2.7. Progesteronbestimmung im Blutplasma und in der Milch mittels Radioimmunoassay

Die Progesteronbestimmung sowohl im Blutplasma als auch in der Milch wurde nach Extraktion mit den von HOFFMANN et al. (1973) bzw. HOFFMANN und HAMBURGER (1973) beschriebenen Radioimmunoassays durchgeführt.

3.2.8. Blutprogesteronbestimmung mittels Schnelltests

Für die quantitative Analyse der Progesteronkonzentrationen im Blut wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Blutplasma-proben verwendet. Die Progesteronbestimmung im Blutplasma erfolgte ohne vorherige Extraktion mittels Enzygnost^R Serumprogesteron-Schnelltest unter Berücksichtigung der mitgelieferten Arbeitsvorschrift.

3.2.9. Einfluß des Milchfettes auf den Progesterongehalt

Wie aus den Methoden hervorgeht, erfolgte die Progesteronbestimmung anhand von Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltests unter Verwendung eines Mikrotiterplattenphotometers. Um einen möglichen Einfluß des Milchfettes auf die Progesteronkonzentration auszuschließen, wurde zusätzlich die Progesteronbestimmung in der Magermilch durchgeführt. Zur Präparation der Magermilch wurden die Reagenzgefäße mit dem Verschuß nach unten zentrifugiert (+4° C;

30 Min.; 1500 g), so daß sich das Milchfett am Boden absetzen und die Magermilchfraktion dekantiert werden konnte (nach MEYER et al., 1986).

3.3. Feldversuch

Das Ziel dieses Versuches besteht darin, den Einsatz eines Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltests im Einzugsgebiet der Ambulatorischen Tierklinik München unter verschiedenen Fragestellungen abzuklären:

- (a) Absicherung der Brunsterkennung durch Bestimmung der Progesteronkonzentration in der Milch und durch Messung des elektrischen Scheidenwiderstandes
- (b) Ermittlung und Verlaufsuntersuchungen von Kühen, die im Diöstrus bzw. mit hohen Progesteronkonzentrationen zur Besamung vorgestellt werden
- (c) Überprüfung von Kühen mit "Doppelbesamungen"
- (d) Progesteronwerte, einschließlich Verlaufsuntersuchungen, bei Kühen mit Ovarialzysten, stiller Brunst, gestörter Gelbkörperfunktion und ähnlichem.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die Progesteronwerte mit dem Enzygnost^R-Test photometrisch ("Minireader" = Mikrotiterplattenphotometer) bestimmt.

3.3.1. Kontrolle des Besamungszeitpunktes

In die Untersuchungen wurden von Juni 1986 bis Juli 1987 aus 116 Betrieben 1044 Kühe der Rassen "Deutsches Fleckvieh" und "Deutsche Schwarzbunte" im Alter von 2 bis 14 Jahren einbezogen. Die Kühe wurden auf Grund äußerer Brunsterscheinungen, nach Anruf des Bauern, zur Erst- oder Nachbesamung vorgestellt. Die äußeren Brunstsymptome (Verhalten, Ödematisierung der Vulva, Absonderung von Brunstschleim) wurden durch klinische Untersuchungen in Form einer Adspektion je nach Intensität in drei Kategorien eingeteilt: deutlich bzw. gut = 3, fraglich bzw. mäßig = 2, kein bzw. schlecht = 1. Die zyklische Veränderung am Genitale wurde durch rektale Palpation unter Einschluß der Bestimmung von Follikeln (Blasen) und Gelbkörpergröße, Uterustonius und -beschaffenheit erhoben. Als weitere Parameter wurden Messungen des elektrischen Scheidenwiderstandes vor der Besamung mit einem von METZGER et al. (1972) beschriebenen Ohmmeter durchgeführt. Die Sonde wurde tief in die Vagina eingeführt, ihr Kopfstück ventral des Orificium uteri externum lokalisiert. Der tiefste Wert kam zur Protokollierung. Die Besamung wurde intrauterin mit Tiefgefriersperma durchgeführt. Viertelgemelksproben wurden zum Zeitpunkt der Besamung gewonnen. Die Zeit der Milchentnahme wurde notiert, um eine eventuelle Korrelation zwischen Tageszeit und Progesteronwert feststellen zu können. Nach einer Beurteilung des Milchsekrets anhand des Schalm-Tests wurden die Proben bei +4° C ohne Zusatz von Konservierungsmittel zur Klinik transportiert und spätestens nach 6 Stunden bei -18° C gelagert. Die Progesteronbestimmung mittels Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltests erfolgte 1 bis 3 Tage nach Gewinnung der Milchproben.

3.3.2. Progesteronbestimmung zur Erfassung des Zyklusverlaufs

Bei "Doppelbesamungen" und bei Kühen mit für eine Brunst zu hohem Progesteronwert wurden Milchproben in zweitägigem Abstand entnommen, bis der Zyklusverlauf deutlich zu erkennen war. Um stille Brunst, Problemkühe und Ovarialzysten zu ermitteln wurden Milchproben ca. 8 Tage vor dem errechneten Brunsttermin und ca. 8 Tage nach der Besamung entnommen. Nach Brunsteinleitung durch ein Prostaglandin F-2-alpha-Analog wurden Milchproben in zweitägigem Abstand genommen, bis der Zyklusverlauf bzw. hohe Progesteronwerte vorlagen. Bei Progesteronwerten, die einer Brunst entsprachen, wurde eine Besamung durchgeführt.

3.3.3. Trächtigkeitsuntersuchung

Die Feststellung der Trächtigkeit erfolgte ca. 8 Wochen nach der Besamung durch rektale Palpation des Uterus.

3.4. Statistische Auswertung

Als statistische Verfahren wurden eingesetzt:

t-Test, Chi-Quadrat Test sowie die Berechnung von Korrelationen und Regressionen (WEBER, 1972).

4. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden, so weit möglich, mit der entsprechenden Auswertung des Radioimmunassays (RIA) verglichen. Da es sich um kommerziell erhältliche Progesteron-Schnelltests (Enzygnost^R-Milch und Serum, Hormonost^R, Progestassay^R, Reprostrip^R) handelt, werden der Besprechung die Angaben der Hersteller über Spezifität, Empfindlichkeit und Genauigkeit zugrunde gelegt.

4.1. Einflüsse der Art des Gemelkes (Vor-, Gesamt- und Nachgemelk) und des Intervalls zwischen Melken und Probenentnahme auf die Progesteronkonzentration in der Milch

Aus den Tabellen 4 - 6 und Abbildung 1 ist ersichtlich, daß es unabhängig von der Bestimmungsmethode (Enzygnost^R Milch-Schnelltest bzw. RIA) deutliche Schwankungen der Progesteronkonzentration bereits beim Einzeltier innerhalb einer Melkzeit sowie zwischen den Melkzeiten gibt. Vergleicht man die unterschiedlichen Progesteronergebnisse in Abhängigkeit von der Gemelksfraktion (Vor-, Gesamt- und Nachgemelk) miteinander, so ergeben sich statistisch keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$). Jedoch ist zu erkennen, daß die Progesteronkonzentrationen aus den Vorgemelksproben zu den niedrigsten, die aus den Nachgemelksproben zu den höchsten Werten tendieren. Außerdem ist zu ersehen, daß, von den Vorgemelken abgesehen, Nachmittagsproben zu höheren Progesteronkonzentrationen führen als Morgenproben. Die Progesteronkonzentrationen, die mit dem Radioimmunoassay bestimmt wurden, liegen niedriger

als die mit dem Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltest. Die Streuungen der Progesteronkonzentration (Gruppe II nicht einbezogen) sind beim Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltest niedriger (Variationskoeffizienten zwischen 7,2 und 26,0) als beim RIA (Variationskoeffizienten 2,2 bis 19,6).

Tab. 4: Milchprogesteronkonzentration in verschiedenen Gemelkarten und zu unterschiedlichen Tageszeiten bei Kühen im Diöstrus ($\bar{x} \pm s$; Gruppe I: n = 3); nach Bestimmung mit dem Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltest und dem Radioimmunoassay

Gemelk	Uhrzeit	Anzahl der Proben	Progesteronkonzentration (ng/ml Vollmilch; $\bar{x} \pm s$)	
			Enzygnost ^R *	RIA
Vorgemelk	4	9	18,1 $\pm$ 2,9	4,8 $\pm$ 1,2
Gesamtgemelk	4	9	20,1 $\pm$ 3,7	6,3 $\pm$ 1,2
Nachgemelk	4	9	20,2 $\pm$ 2,0	7,4 $\pm$ 1,8
Vorgemelk	7	3	20,1 $\pm$ 0,8	5,0 $\pm$ 1,3
Vorgemelk	10	3	18,5 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 1,5
Vorgemelk	13	3	18,0 $\pm$ 0,4	6,7 $\pm$ 0,5
Vorgemelk	15	9	19,3 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 1,9
Gesamtgemelk	15	9	20,3 $\pm$ 2,2	6,7 $\pm$ 2,7
Nachgemelk	15	9	20,8 $\pm$ 2,1	7,6 $\pm$ 3,5

Differenzen zwischen den Gemelkarten und Entnahmezeiten nicht signifikant ($P > 0,05$; t-Test)

* photometrische Auswertung

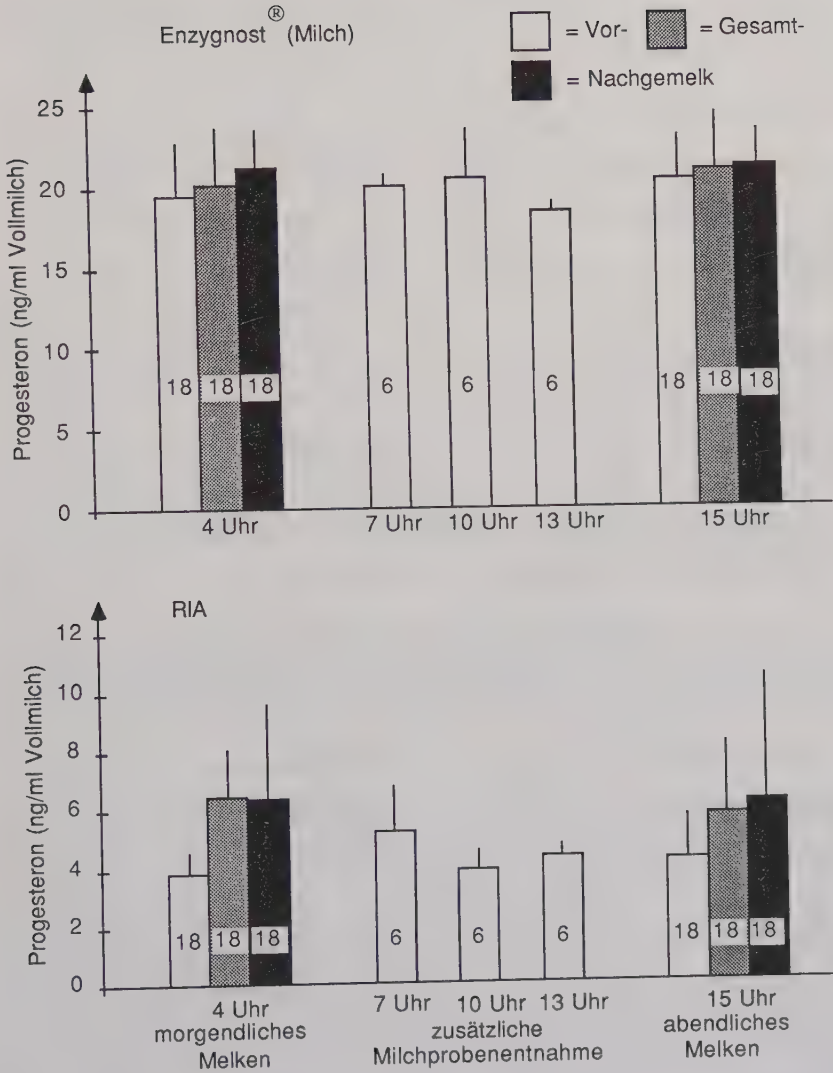


Abb. 1: Milchprogesteronkonzentration in verschiedenen Gemelkart und zu unterschiedlichen Tageszeiten von 6 Kühen mit aktivem Corpus luteum (Mittelwert und Standardabweichung; Werte in den Säulen = Anzahl der Proben).

Tab. 5: Milchprogesteronkonzentration in verschiedenen Gemelkarten und zu unterschiedlichen Tageszeiten bei azyklischen Kühen ($\bar{x} \pm s$; Gruppe II: $n = 2$); nach Bestimmung mit dem Enzygnost Milchprogesteron-Schnelltest und dem Radioimmunoassay

Gemelk	Uhrzeit	Anzahl der Proben	Progesteronkonzentration (ng/ml Vollmilch; $\bar{x} \pm s$) Enzygnost*	RIA
Vorgemelk	4	6	0,2 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,1
Gesamtgemelk	4	6	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1
Nachgemelk	4	6	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,3
Vorgemelk	7	2	0,3 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,1
Vorgemelk	10	2	0,3 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1
Vorgemelk	13	2	0,3 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1
Vorgemelk	15	6	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1
Gesamtgemelk	15	6	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1
Nachgemelk	15	6	0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1

Differenzen zwischen den Gemelkarten und Entnahmezeiten nicht signifikant ($P > 0,05$; t-Test)

* photometrische Auswertung

Tab. 6: Milchprogesteronkonzentration in verschiedenen Gemelkarten und zu unterschiedlichen Tageszeiten bei Kühen im 3. Trächtigkeitsmonat ($\bar{x} \pm s$; Gruppe III: $n = 3$); nach Bestimmung mit dem Enzygnost Milchprogesteron-Schnelltest und dem RIA

Gemelk	Uhrzeit	Anzahl der Proben	Progesteronkonzentration (ng/ml Vollmilch; $\bar{x} \pm s$) Enzygnost*	RIA
Vorgemelk	7	9	22,0 $\pm$ 1,5	4,1 $\pm$ 0,3
Gesamtgemelk	7	9	21,5 $\pm$ 3,1	6,1 $\pm$ 0,7
Nachgemelk	7	9	22,1 $\pm$ 2,3	6,9 $\pm$ 0,6
Vorgemelk	10	3	20,3 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,5
Vorgemelk	13	3	22,9 $\pm$ 2,2	3,7 $\pm$ 1,1
Vorgemelk	16	3	21,5 $\pm$ 2,2	4,1 $\pm$ 1,0
Vorgemelk	17	9	21,9 $\pm$ 1,0	4,5 $\pm$ 0,6
Gesamtgemelk	17	9	21,9 $\pm$ 4,3	6,9 $\pm$ 0,7
Nachgemelk	17	9	23,5 $\pm$ 1,5	6,9 $\pm$ 0,5

Differenzen zwischen den Gemelkarten und Entnahmezeiten nicht signifikant ($P > 0,05$; t-Test)

* photometrische Auswertung

4.2. Progesteronkonzentration im Blutplasma

Sowohl bei Anwendung des Radioimmunoassays als auch bei Anwendung des Enzygnost^R Serumprogesteron-Schnelltests wird deutlich, daß bei den Kühen der Gruppen I (im Diöstrus) und III (im 3. Trächtigkeitsmonat) ein endokrin aktives Corpus luteum vorhanden ist. Es besteht kein Unterschied zwischen den Progesteronkonzentrationen der Gruppe I und der Gruppe III ($P > 0,05$). Die Kühe der Gruppe II weisen erwartungsgemäß niedrige Progesteronkonzentrationen im Blutplasma auf, d.h. sie zeigen keine luteale Aktivität. Die Enzygnost^R-Plasmawerte stimmen weitgehend mit den RIA-Werten überein ($r = 0,8$; $P \leq 0,01$). Jedoch ist zu erkennen, daß die Progesteronwerte, die durch Enzygnost^R Serum- sowie durch Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltests ermittelt wurden, höher liegen, als die durch Radioimmunoassay erhaltenen Werte (s. Tab. 7 - 9). Bestimmt man die Progesteronkonzentration in der Milch vergleichend mit Enzygnost^R Milch- und Serumprogesteron-Schnelltests, so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen. Das gleiche gilt für die Bestimmung von Progesteron im Plasma mit Enzygnost^R Serum- und Milchprogesteron-Schnelltests (Tab. 10). Der Regressionskoeffizient ist statistisch hoch abgesichert. Der Milchprogesterongehalt liegt bei beiden Bestimmungsmethoden nahe beieinander ($r = 0,95$; $P \leq 0,01$). In Abbildung 2 sind diese Beziehungen graphisch dargestellt. Die Gleichung für die lineare Regression lautet: $y = 0,35 + 0,99x$; wobei auf der x-Koordinate die Enzygnost^R Milch- und auf der y-Koordinate die Enzygnost^R Serum-Schnelltest-Konzentrationen aufgetragen wurden.

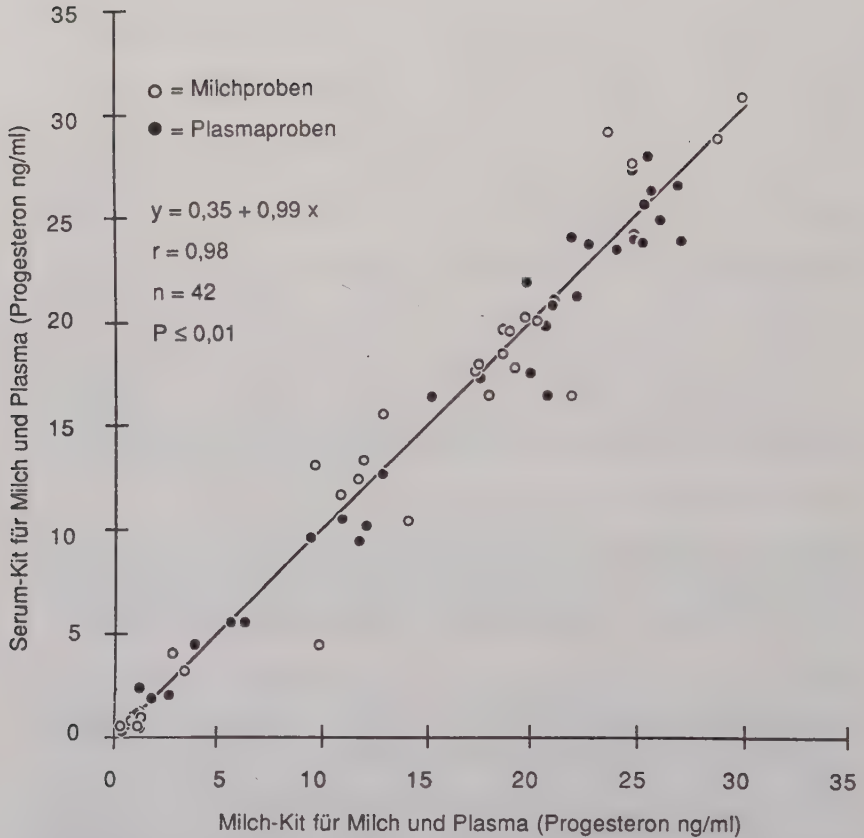


Abb. 2: Darstellung der Progesteronkonzentration in Milch und Plasma von Kühen, jeweils ermittelt mit den Enzygnost® Milch- und Serum- Progesteronschnelltests und der ermittelten Regressionsgleichung.

Tab. 7: Progesteronkonzentration im Blutplasma von Kühen im Diöstrus ($\bar{x} \pm s$; Gruppe I : n = 3); nach Bestimmung mit dem Enzygnost Serumprogesteron-Schnelltest und dem RIA

Tag der Proben-entnahme	Uhrzeit	Anzahl der Proben	Progesteronkonzentration (ng/ml Blutplasma; $\bar{x} \pm s$) Enzygnost*	RIA
1	7	3	21,6 $\pm$ 1,7	5,4 $\pm$ 2,9
	15	3	19,9 $\pm$ 2,7	4,9 $\pm$ 2,7
2	7	3	20,8 $\pm$ 1,8	5,8 $\pm$ 2,3
	15	3	20,3 $\pm$ 1,9	6,4 $\pm$ 1,4
3	7	3	21,5 $\pm$ 2,2	5,7 $\pm$ 2,2
	15	3	21,5 $\pm$ 1,4	6,1 $\pm$ 1,7

Differenzen zwischen den Entnahmezeiten nicht signifikant (P > 0,05; t-Test)

* photometrische Auswertung

Tab. 8: Progesteronkonzentration im Blutplasma von azyklischen Kühen ($\bar{x} \pm s$; Gruppe II : n = 2); nach Bestimmung mit dem Enzygnost Serumprogesteron-Schnelltest und dem Radioimmunoassay

Tag der Proben-entnahme	Uhrzeit	Anzahl der Proben	Progesteronkonzentration (ng/ml Blutplasma; $\bar{x} \pm s$) Enzygnost*	RIA
1	7	2	0,5 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,0
	15	2	0,6 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,0
2	7	2	0,6 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,0
	15	2	0,6 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,0
3	7	2	0,6 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,1
	15	2	0,6 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,1

Differenzen zwischen den Entnahmezeiten nicht signifikant (P > 0,05; t-Test)

* photometrische Auswertung

Tab. 9: Progesteronkonzentration im Blutplasma von Kühen im 3. Trächtigkeitsmonat ($\bar{x} \pm s$; Gruppe III : n = 3); nach Bestimmung mit dem Enzygnost Serumprogesteron-Schnelltest und dem Radioimmunoassay

Tag der Probenentnahme	Uhrzeit	Anzahl der Proben	Progesteronkonzentration (ng/ml Blutplasma; $\bar{x} \pm s$)	Enzygnost*	RIA
1	7	3	20,2 $\pm$ 1,6	4,8 $\pm$ 3,1	
	17	3	21,5 $\pm$ 1,9	5,1 $\pm$ 2,1	
2	7	3	21,5 $\pm$ 1,8	4,2 $\pm$ 0,9	
	17	3	20,4 $\pm$ 1,5	6,0 $\pm$ 1,3	
3**					

Differenzen zwischen den Entnahmezeiten nicht signifikant ($P > 0,05$; t-Test)

* photometrische Auswertung

** keine Blutproben vorhanden

Tab. 10: Vergleich von Enzygnost^R-Serum mit Enzygnost^R-Milch zur Bestimmung der Progesteronkonzentration bei aktivem Corpus luteum in der Milch und im Blutplasma

Methoden:	Enzygnost ^R -Serum (n = 42)	Enzygnost ^R -Milch (n = 42)				
=====						
Probe	Progesteronkonzentration (ng/ml)					
	$\bar{x}$	$\pm$	s	$\bar{x}$	$\pm$	s
Blutplasma	22,8	$\pm$	2,5	20,8	$\pm$	3,0
Milch	21,5	$\pm$	3,2	22,3	$\pm$	3,8

Differenzen zwischen Enzygnost - Serum und Enzygnost - Milch nicht signifikant ($P > 0,05$; t-Test)

4.3. Progesteronprofil im Zyklus (Bestimmung mit dem Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltest)

Für die Erstellung des Progesteronhormonprofils wurden 10 normozyklische Kühe herangezogen (Abb. 3). Folgende Aussagen lassen sich ableiten: Der Anstieg der Progesteronkonzentration ist ab Tag 4 des Zyklus erkennbar. Zwischen dem 11. und 18. Tag wird ein Maximum (Plateauphase) erreicht. Der Abfall beginnt zwischen dem 19. und 20. Tag. In der Anstiegs-, Plateau- und Abfallphase liegen relativ große Variationsbreiten vor, während bei niedrigen Progesteronwerten um den Zeitpunkt der Brunst auch die Variationsbreiten gering sind. Das Progesteronprofil der RIA-Werte korreliert in hohem Maße mit dem Wert des Enzygnost^R Milch-Schnelltests ($r = 0,8$; $P \leq 0,01$). Jedoch liegen die Enzygnost^R-Milchwerte höher als die RIA-Werte. In Abbildung 4 ist der Verlauf der Progesteronkonzentration (Enzygnost^R-Milch) und des Fettgehaltes der Milch während des Zyklus einer Kuh vergleichend dargestellt. Der Milchfettgehalt schwankt zwischen 3,0 und 8,3 mg% (im Durchschnitt $5,6 \pm 1,7$ mg%). Eine Korrelation zwischen Fettgehalt und Progesteronkonzentration in der Milch läßt sich nicht nachweisen ($r = 0,2$; $P > 0,05$). Die Unterschiede in der Progesteronkonzentration sind in erster Linie vom Zyklusstand der Kuh abhängig und nicht vom Milchfettgehalt.

4.4. Das Progesteronprofil während der Frühgravidität

In Abbildung 5 ist der Verlauf der mittleren Progesteronkonzen-

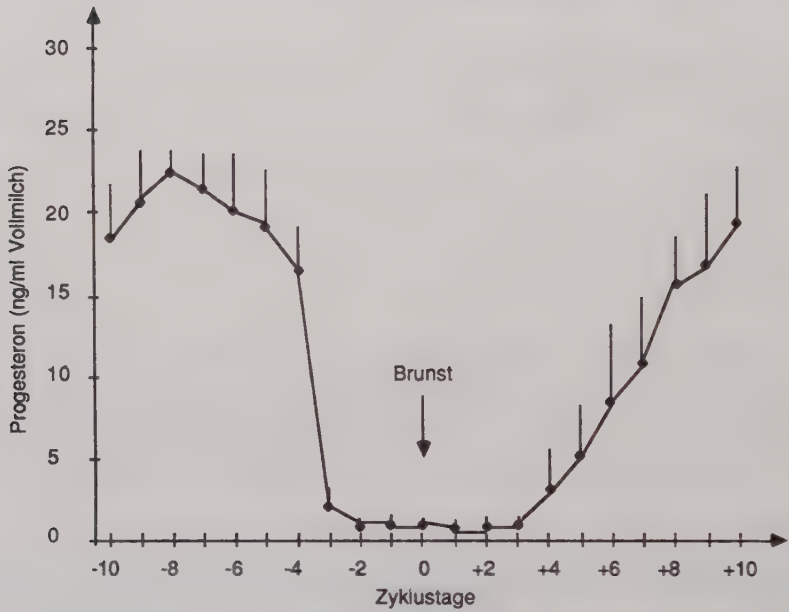


Abb. 3: Progesteronkonzentration (Mittelwert und Standardabweichung) von 10 umrindernden Kühen bestimmt mittels Enzygnost[®] Milchprogesteron-Schnelltest.

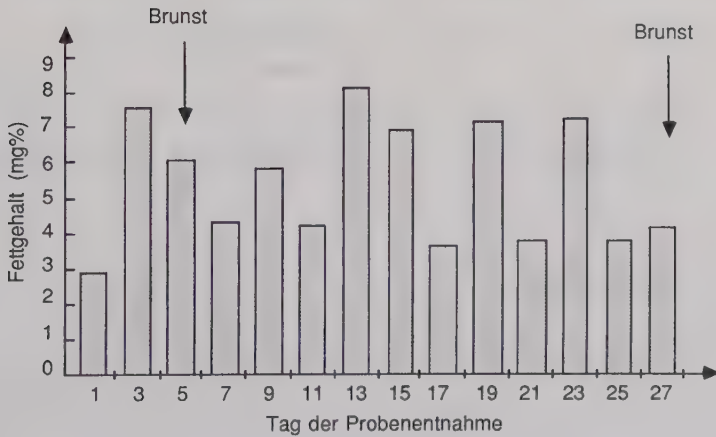
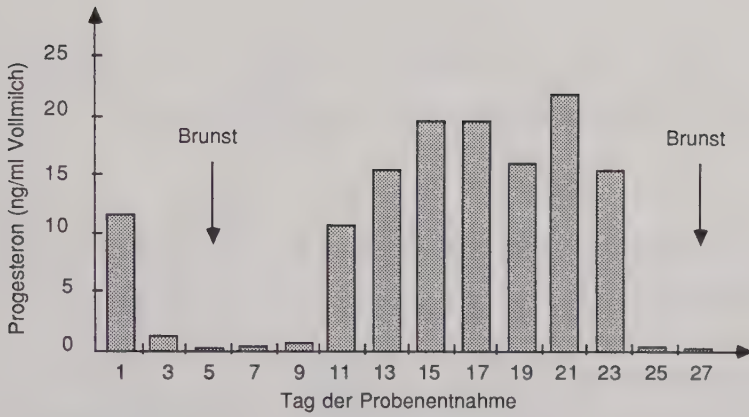


Abb. 4: Schematischer Verlauf der Progesteronkonzentration und des Fettgehaltes in der Vollmilch während des Zyklus einer Kuh.

trationen in der Milch von 6 Kühen vom Tag der Besamung bis zum 36./40. Tag der Gravidität dargestellt. Die Probenentnahme erfolgte im Abstand von zwei Tagen. Die Trächtigkeit wurde durch rektale Untersuchung diagnostiziert. Am 8. Tag nach der Insemination stieg die Progesteronkonzentration deutlich an und blieb bis zum Ende der Untersuchung in etwa auf diesem Niveau.

4.5. Vergleich der Progesteronprofile während des Zyklus und der Frühgravidität

In Abbildung 6 sind die Progesteronprofile für den Zyklus und die Frühgravidität vergleichend dargestellt. Sie verhalten sich vom 1. bis 18. Tag nach der Brunst nahezu gleich. Am 20. Tag nach der Besamung sind die Unterschiede zwischen nichtträchtigen und trächtigen Kühen eindeutig. Bei den tragenden Kühen liegt weiterhin eine gleichbleibend hohe Progesteronkonzentration vor, während sie bei nichtträchtigen Kühen nach dem 18. Tag stark abfällt.

4.6. Der Schwellenwert

Der Schwellenwert dient zur Differenzierung zwischen endokrin aktivem und nichtaktivem Corpus luteum bzw. Lutealgewebe. Er stellt nach McPHEE und TIBERGHIE (1987) das Mittel aus einem Wert zwei Standardabweichungen über dem niedrigsten Progesteronwert und einem Wert zwei Standardabweichungen unter dem höchsten Progesteronwert dar. In der Abbildung 7 wird der durch lineares und semi-

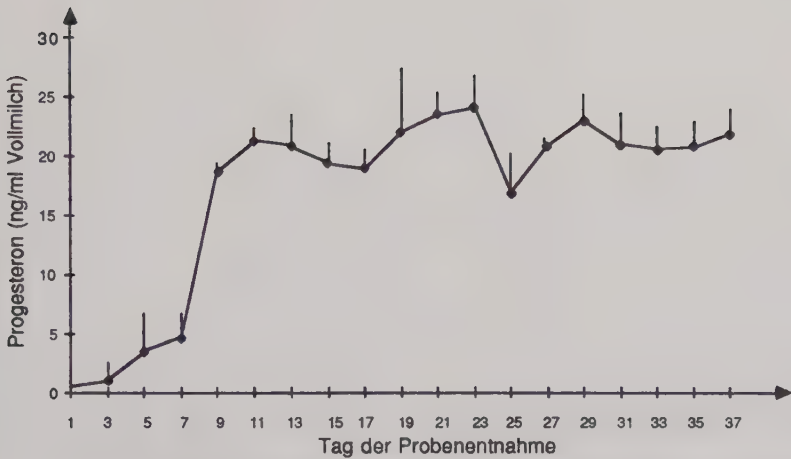


Abb. 5: Progesteronkonzentration von 6 tragenden Kühen bestimmt mittels Enzygnost® Schnelltest (Mittelwert und Standardabweichung).

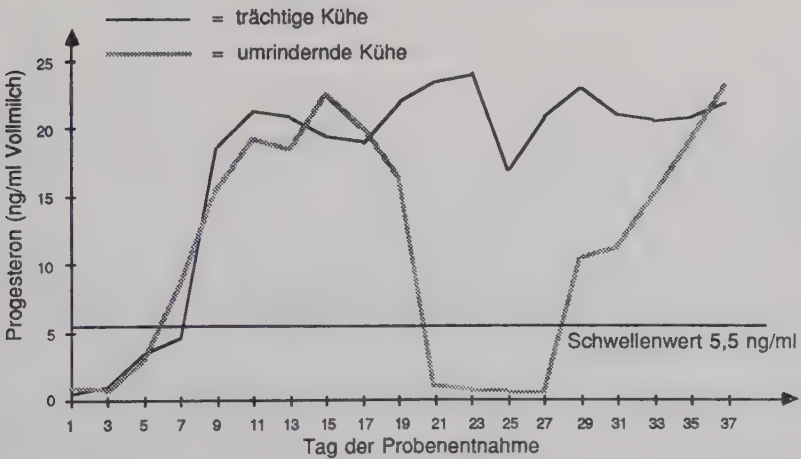


Abb. 6: Progesteronkonzentration in der Milch von 10 umrindernden und 6 tragenden Kühen bestimmt mittels Enzygnost® Milchschnelltest.

logarithmisches Verfahren erhaltene Verlauf der mittleren Progesteronkonzentration umrindernder Kühe ($n = 10$) miteinander verglichen. Beide Darstellungsformen werden in der Literatur zur Datenauswertung von Progesteronkonzentrationen verwendet (THUN et al., 1980; ARNSTADT et al., 1982; ELMORE, 1986a). Folgende Aussagen lassen sich ableiten: Die linearen Werte sind auf dem Plateau meist höher als die semilogarithmischen. Die errechneten Schwellenwerte liegen gerundet bei 5,5 ng/ml nach semilogarithmischer und bei 7,5 ng/ml nach linearer Auswertung. Beide Verfahren korrelieren in hohem Maß ($r = 0,9$; $P \leq 0,01$). In dieser Arbeit wird die lineare Auswertung, wie von ELMORE (1986a) für Progesteron-Schnelltests empfohlen, verwendet. Durch die nach Besamungen gemachten Erfahrungen (s. 4.10.) ließ sich der linear errechnete Schwellenwert von 7,5 ng/ml Vollmilch jedoch nicht halten. Ein Schwellenwert von 5,5 ng/ml Vollmilch erwies sich am günstigsten und wurde deshalb in dieser Arbeit verwendet. Bei allen Kühen (Abb. 3 und Abb. 5) liegt die Progesteronkonzentration in der Vollmilch zwischen dem 7. und dem 19. Tag des Zyklus über dem Schwellenwert von 5,5 ng/ml.

4.7. Beurteilung des Enzygnost^R-Schnelltests

4.7.1. Intraassay- und Interassay-Variationskoeffizient

Als Maß für die Variation gilt die Standardabweichung (s) und der Variationskoeffizient ($v\%$). In Tabelle 11 ist die Streuung der Konzentration bei wiederholten Messungen von Serie zu Serie

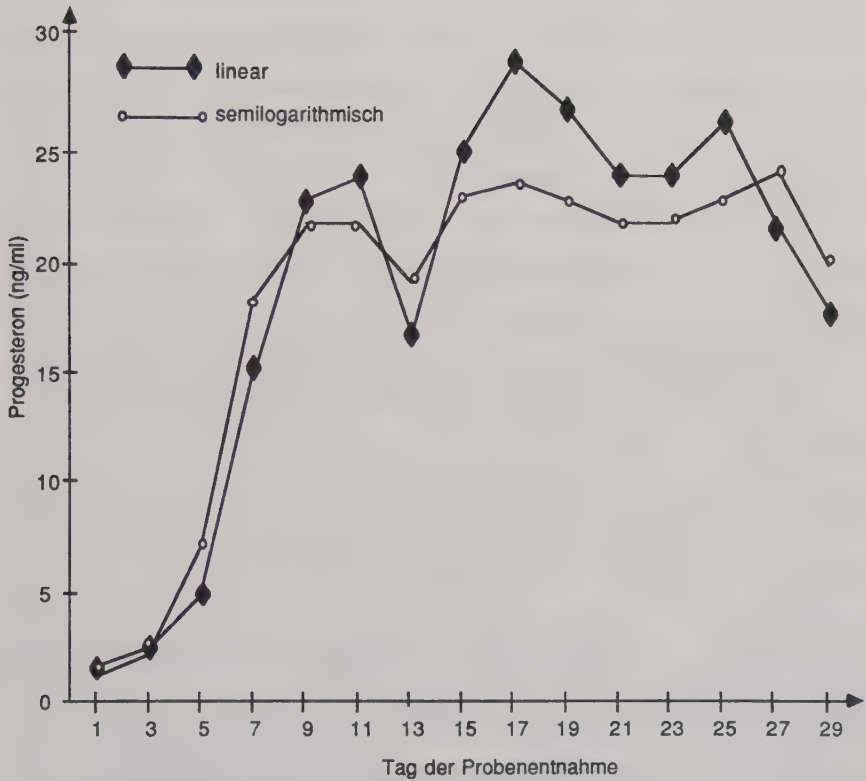


Abb. 7: Durchschnittliche Progesteronkonzentrationen in der Milch von 10 Kühen anhand linearer und semilogarithmischer Standardkurven ermittelt.

(Interassay-Variationskoeffizient bzw. die Reproduzierbarkeit) aufgeführt. Sie beträgt 16,7 bis 17,9% abhängig vom Konzentrationsbereich. Der Intraassay-Variationskoeffizient beträgt 2,9 bis 9,0%. Die entsprechenden Werte für Plasma betragen 17,9 bzw. 16,8% (Interassay) und 3,5 bzw. 5,8% (Intraassay). Die Mittelwerte der "Kontrollmilch" (Milchproben mit bekannt hohem bzw. niedrigem Progesteronwert) schwanken zwischen 18,5 ng/ml und 22,6 ng/ml für die hohe Konzentration und zwischen 0,8 ng/ml und 1,6 ng/ml für die niedrige Konzentration. Die Mittelwerte der "Kontrollseren" (Plasmaproben mit bekannt hohem bzw. niedrigem Progesteronwert) liegen zwischen 20,2 und 24,2 ng/ml bei hoher und zwischen 0,8 und 1,2 ng/ml bei niedriger Progesteronkonzentration.

Tab. 11: Intraassay- und Interassay-Variationskoeffizienten

=====			
Kriterium	Vollmilch		
=====			
Progesteron- konzentration	Anzahl der Bestimmungen	Interassay v%*	Intraassay v%*
=====			
niedrig	52	17,9	2,9
hoch	52	16,7	9,0
=====			
Blutplasma			
=====			
niedrig	6	17,9	3,5
hoch	6	16,8	5,8
=====			

* v% = Variationskoeffizient

4.7.2. Qualität der Antikörperbeschichtung

Der Variationskoeffizient der Extinktionen von frisch geöffneten

Mikrotiterplatten ohne Testdurchführung liegt bei 2,2%. Der Variationskoeffizient der Extinktion nach Zugabe von 100 µl enzym-markiertem Progesteron-Konjugat (d.h. Konjugat als Substrat) liegt bei 2,8%. In Tabelle 12 ist der Variationskoeffizient der Extinktion des fertig durchgeführten Ansatzes der Mikrotiterplatten von 0 bis 48 Stunden nach dem Ansetzen dargestellt. Die Messung bei 0 Stunden wurde zweimal durchgeführt. Die erste Messung diente als Referenzwert (100%) für alle folgenden Messungen. Die Schwankung lag zwischen 3,8% und 6,5%.

Tab. 12: Einfluß der Lagerung des bereits durchgeführten Ansatzes auf die Extinktion bei hoher Progesteronkonzentration

Lagerung bei	Uhrzeit (Stunden)				
	0 * (n=40) v%	6 (n=30) v%	12 (n=25) v%	36 (n=40) v%	48 (n=40) v%
4°C	3,8	3,8	3,9	4,0	4,2
Zimmer- temperatur	3,8	3,8	4,5	5,6	6,5

v% = Variationskoeffizient.

* = Die Messungen mittels Mikrotiterplattenphotometer wurden zweimal durchgeführt.

4.7.3. Prozentuale Abweichungen der Doppelbestimmungen

Bei der prozentualen Berechnung wurde jeweils der erste Wert der Doppelbestimmung aus einer Probe gleich 100% gesetzt. Aus den in Tabelle 13 zusammengestellten Ergebnissen geht hervor, daß die

prozentualen Abweichungen der einzelnen Doppelbestimmungen bei hohen Konzentrationen über dem Schwellenwert von 5,5 ng/ml Vollmilch um 2,8 bis 4,8% differieren. Bei Konzentrationen unter dem Schwellenwert liegen die Abweichungen bei 4,8 bis 4,9%. Für Plasma liegen die Werte in einer ähnlichen Größenordnung. Die Abweichungen bei eingefrorenen Proben sind in der Regel höher als bei frischen.

Tab. 13: Prozentuale Abweichungen der Doppelbestimmungen gleicher Milchproben, frisch und nach Einfrieren; nach Bestimmung mit dem Enzygnost-Milchprogesteron-Schnelltest

Progesteron-Konzentration (ng/ml)	Anzahl der Proben	Abweichungen	
		Frische Milch %	Eingefrorene Milch %
unter 5,5	300	4,8	4,9
5,5 - 10	60	4,8	4,5
über 10	40	2,8	3,2

		Abweichungen	
		Frisches Plasma %	Eingefrorenes Plasma %
unter 5,5	20	4,2	4,4
5,5 - 10	15	4,1	4,9
über 10	15	2,5	4,2

Differenzen nicht signifikant ($P > 0,05$; t-Test)

4.8. Vergleich der Ergebnisse der Progesteronkonzentration in der Milch nach Bestimmung mit dem Enzygnost^R Milch-Schnelltest, dem Hormonost^R, dem Progestassay^R, dem Reprostrip^R und dem Radioimmunoassay

4.8.1. Zuverlässigkeit der verschiedenen Tests

Die Zuverlässigkeit der verschiedenen Tests wurde nach bestimmten Kriterien, und zwar a) eindeutig richtig, b) fraglich und c) eindeutig falsch beurteilt (s. Tab. 14 - 18). Für die Richtigkeit dieser Beurteilung wurde nicht nur der Wert eines Progesterontests, z.B. des RIA, sondern auch die klinischen Befunde der Tiere herangezogen (GERSTMAN und CAPPUCI, 1986). Es wurden Kühe bekannter Zyklusstadien und mit der rektalen Diagnose "Corpus luteum" bzw. trächtige Kühe einbezogen, d.h. die Erwartung der Bestimmung war ein hoher Progesteronwert um das Ergebnis "eindeutig richtig" zu erhalten. Zwar gilt der RIA als besonders zuverlässig, jedoch treten auch hier Interassay- und Intraassay-Variationskoeffizienten auf. Bei visueller Auswertung von Enzygnost^R, Progestassay^R und Reprostrip^R wurden die Proben von 2 verschiedenen Personen beurteilt. Für die Endbewertung bei unterschiedlicher Beurteilung diente das arithmetische Mittel.

Bei der photometrischen Auswertung besteht die höchste Zuverlässigkeit (100%) für den Enzygnost^R Milch-Schnelltest mit dem Mikrotiterplattenphotometer. Die visuelle Auswertung des Enzygnost^R Milch-Schnelltest liegt darunter. Bei visueller Auswer-

Tab. 14: Zuverlässigkeit für hohe Progesteronkonzentrationen der verschiedenen Progesteron-Schnelltests (%)

Methode (Auswertung)	(a)* Eindeutig Richtig		(b)** Fraglich		(c)*** Eindeutig Falsch	
	n	%	n	%	n	%
Radioimmunoassay (n=126)	124	98,4	2	1,6	-	-
Enzygnost ^R (n=126)						
visuell (direkt)	120	95,2	6	4,8	-	-
visuell (blind)	113	89,7	13	10,3	-	-
photometrisch	122	96,8	4	3,2	-	-
Minireader	126	100	-	-	-	-
Hormonost ^R (n=42)						
photometrisch	40	95,2	2	4,8	-	-
Progestassay ^R (n=63)						
visuell (direkt)	55	87,3	8	12,7	-	-
Reprostrip ^R (n=63)						
visuell (direkt)	63	100	-	-	-	-

photometrisch = Standardphotometer; Minireader = Mikrotiterplattenphotometer

* (a) = eindeutig richtig, d.h., die Progesteronwerte bestätigen den klinischen Befund.

** (b) = fraglich, d.h., die Progesteronwerte liefern einen Grenzwert

*** (c) = eindeutig falsch, d.h., die Progesteronwerte stimmen nicht mit dem klinischen Befund überein.

(a-c) = Kriterien gemäß den Richtwerten der Firmen bei Enzygnost, Hormonost, Reprostrip und Progestassay

Tabelle 14 wurde in folgende Kategorien eingeordnet:

Schwellenwerte (ng/ml Vollmilch)**					Interpretation
Enzygnost	Hormonost	Progestassay	Reprostrip	RIA	
≤ 5,5	≤ 5	niedrig	≤ 2,5	≤ 2	Brunst; keine luteale Phase
5,5 - 10	5 - 10	mittel	2,5 - 10,5	2 - 11	fraglich; beginnende/ende luteale Phase
> 10	> 10	hoch	> 10,5	> 11	Lutealphase/Trächtigkeit

** Schwellenwerte nach Arbeitsanleitung der Tests; RIA nach HOFFMANN und HAMBURGER (1973).

Tab. 15: Vergleich der Progesteronwerte in der Milch zwischen Enzygnost^R, Hormonost^R, Progestassay^R, Reprostrip^R und RIA (3 Kühe im Diöstrus; $\bar{x} \pm s$)

Gemelk	Uhrzeit	Progesteronkonzentration				
		Enzygnost (ng/ml)	Hormonost (ng/ml)	Progestassay (H, M, N)*	Reprostrip (ng/ml)**	RIA (ng/ml)
Vorgemelk	4	18,1 $\pm$ 2,9	14,6 $\pm$ 2,9	M	10,5	4,8 $\pm$ 1,2
Gesamt- gemelk	4	20,1 $\pm$ 3,7	23,7 $\pm$ 4,5	H	10,5	6,3 $\pm$ 1,9
Nachgemelk	4	20,2 $\pm$ 2,0	27,6 $\pm$ 6,7	H	10,5	7,4 $\pm$ 1,8
Vorgemelk	7	20,1 $\pm$ 0,8	22,1	H	10,5	5,0 $\pm$ 1,3
Vorgemelk	10	18,5 $\pm$ 0,4	20,9	H	10,5	6,1 $\pm$ 1,5
Vorgemelk	13	18,0 $\pm$ 0,4	25,2	H	10,5	6,7 $\pm$ 0,5
Vorgemelk	15	19,3 $\pm$ 0,5	23,4 $\pm$ 2,6	H	10,5	4,5 $\pm$ 1,9
Gesamt- gemelk	15	20,3 $\pm$ 2,2	24,3 $\pm$ 3,3	H	10,5	6,7 $\pm$ 2,7
Nachgemelk	15	20,8 $\pm$ 2,1	21,1 $\pm$ 2,6	H	10,5	7,6 $\pm$ 3,5

Die Differenzen zwischen den Tests sind signifikant ($P \leq 0,05$; t-Test)

* H = hohe, M = mittlere und N = niedrige Progesteronkonzentration

** zwei Standards à 2,5 und 10,5 ng/ml; keine Standardabweichung, da alle Werte im Bereich von 10,5 ng/ml lagen

Tab. 16: Zuverlässigkeit verschiedener Progesteronschnelltests in Abhängigkeit von der Gemelkart.

Methode (Auswertung)	Vorgemelk			Gesamtgemelk			Nachgemelk		
	a*	b**	c***	a*	b**	c***	a*	b**	c***
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Radioimmunoassay (n=36)	100	-	-	100	-	-	94,4	5,6	-
Enzygnost (n=36)									
visuell(direkt)	97,2	2,8	-	97,2	2,8	-	88,9	11,1	-
visuell(blind)	91,7	8,3	-	88,9	11,1	-	83,3	16,7	-
photometrisch	100	-	-	88,9	11,1	-	100	-	-
Minireader	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Hormonost (n=21)									
photometrisch	95,2	4,8	-	100	-	-	100	-	-
Progestassay (n=18)									
visuell(direkt)	72,2	27,7	-	94,4	5,6	-	94,4	5,6	-
Reprostrip (n=18)									
visuell(direkt)	100	-	-	100	-	-	100	-	-

photometrisch = Standardphotometer; Minireader = Mikrotiterplattenphotometer.

- * (a) = eindeutig richtig, d.h., der Progesteronwert bestätigt den klinischen Befund.
- ** (b) = fraglich, d.h., der Progesteronwert liefert einen Grenzwert
- *** (c) = eindeutig falsch, d.h., der Progesteronwert stimmt nicht mit dem klinischen Befund überein.
- (a-c) = Kriterien gemäß den Richtwerten der Firmen bei Enzygnost^R, Hormonost^R, Reprostrip^R und Progestassay^R

tung ergab der Reprostrip-Schnelltest mit nur zwei Standards eine hohe Zuverlässigkeit (100%). Schnelltests, deren Eichkurven auf Grund mehrerer Standards erstellt wurden, ermöglichen eine genaue photometrische Auswertung. Mehrere Standards erschweren dagegen die visuelle Auswertungsgenauigkeit. Zwischen visueller und photometrischer Beurteilung des Enzygnost^R-Schnelltests besteht eine signifikante Korrelation ($r = 0,9$; $P \leq 0,01$).

Tab. 17: Korrelation (r) zwischen den Progesteronergebnissen anhand verschiedener Progesterontests

Methode	Enzygnost (photometrisch)	Enzygnost (Minireader)	Reprostrip (visuell)	Progestassay (visuell)	RIA
Enzygnost ^R (photometrisch)	-	0,93	0,63	0,58	0,68
Enzygnost ^R (Minireader)	-	-	0,82	0,82	0,75
Hormonost ^R (photometrisch)	-	0,54	-	-	0,56
Reprostrip ^R (visuell direkt)	-	-	-	0,95	0,63
Progestassay ^R (visuell direkt)	-	-	-	-	0,63

Enzygnost; Hormonost (photometrisch) = nach standardspektrophotometrischer Messung oder Enzygnost (Minireader) nach mikrotiterplattenphotometrischer Auswertung

Tab. 18: Korrelation (r) zwischen den Progesteronergebnissen bei verschiedenen Auswertungsmöglichkeiten des Enzygnost-Tests

Auswertung	Methode der Auswertung*			
	Spektralphoto- meter	Mikrotiter- plattenpho- tometer	visuell (direkt)	blind (verdeckt)
Standard- photometer	-	0,93	0,87	0,80
Mikrotiter- plattenpho- tometer	-	-	0,94	0,91
Visuell (direkt)	-	-	-	0,92

Die Korrelationen sind signifikant ($P \leq 0,01$)

* Anzahl der Proben = 126

4.9. Einfluß des Zellgehaltes der Vollmilch (Schalm-Test) auf die Progesteronkonzentration

Euterviertel mit einem Zellgehalt von mehr als 5.000.000 Zellen pro ml Vollmilch (Schalm-Test) wurden für diese Untersuchung als an Mastitis erkrankt beurteilt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei Milchprogesteron-, Fett- und Gesamteiweißwerten zwischen gesunden und erkrankten Vierteln im Vorgemelk gefunden (s. Tab. 19). Progesteronkonzentrationen in der Milch von gesunden und erkrankten Vierteln sind sowohl im niederen als auch im hohen Bereich gleich. Die höchsten Konzentrationsunterschiede bei einem Tier waren 2,2 ng/ml Vollmilch. Die Korrelation der

Tab. 19: Vergleich der Progesteronkonzentration in Milch zweier Euterviertel; ($\bar{x} \pm s$); nach Bestimmung mit dem Enzygnost Milchprogesteron-Schnelltest

(a) Vergleich zwischen erkranktem und gesundem Euterviertel

(n = 33 Paare)	Euterviertel	
	krank	gesund
Vollmilch		
Progesteronkonzentration (ng/ml)		
niedrig (n = 16)	3,1 $\pm$ 3,1	2,9 $\pm$ 2,8
hoch (n = 17)	21,2 $\pm$ 3,8	21,4 $\pm$ 3,3
Fett (mg%)	3,2 $\pm$ 1,2	3,0 $\pm$ 1,3
Eiweiß (mg%)	3,8 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,4
Magermilch		
Progesteronkonzentration (ng/ml)		
niedrig (n = 16)	0,8 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,3
hoch (n = 17)	10,5 $\pm$ 3,2	11,3 $\pm$ 3,2

(b) Vergleich zwischen den gesunden Eutervierteln A und B

Vollmilch (n = 6 Paare)	(A)	(B)
Progesteronkonzentration (ng/ml)		
hoch (n = 6)	20,8 $\pm$ 3,2	20,9 $\pm$ 2,9
Fett (mg%)	3,3 $\pm$ 1,0	3,3 $\pm$ 1,3
Eiweiß (mg%)	3,7 $\pm$ 1,2	3,8 $\pm$ 0,6

=====

Differenzen zwischen "krank" und "gesund" sowie zwischen "A" und "B" nicht signifikant ($P > 0,05$; t-Test)

Progesteronkonzentrationen, die bei gesunden und erkrankten Vierteln gemessen wurden, ist signifikant ($r = 0,9$; $P \leq 0,05$). Es besteht keine Korrelation zwischen Progesteronkonzentration in der Milch und MilCHFett ($r = 0,2$; $P > 0,05$). Bei Vollmilchproben von 6 gesunden Kontrollkühen jeweils aus Viertel A und B ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in Progesteron-, Fett- und Gesamteiweißwerten. Beim Vergleich von Magermilch aus gesunden und erkrankten Vierteln ergeben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Progesteronkonzentration. Die Korrelation von Progesteronwerten in Magermilch, gemessen bei gesunden und erkrankten Eutervierteln, ist ebenfalls signifikant ($r = 0,9$; $P \leq 0,01$). Die Progesteronkonzentrationen, die mit dem Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltest gemessen werden, liegen bei 14,5 ng/ml Magermilch für die höchsten und 0,86 ng/ml Magermilch für die niedrigsten gemessenen Werte.

4.10. Kontrolle des Besamungszeitpunktes

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 1044 Besamungen untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 20 bis 27 dargestellt. Aus Tabelle 20 ist zu ersehen, daß im Monat Mai die meisten Besamungen erfaßt wurden. Die höchste Trächtigkeitsrate liegt im Dezember. Diese Angaben sollen nur die in die Untersuchungen einbezogen Inseminationen charakterisieren. Sie sind nicht als repräsentativ für einen jahreszeitlichen Regelkreis anzusehen, weil das Erfassen der Besamungen für diese Untersuchungen in weitem Maße durch arbeitstechnische Faktoren bestimmt wurde.

Tab. 20: Monatliche Verteilung der Besamungen und Trächtigkeitsraten

Monat	Besamungen		Progesteron- Konzentration (ng/ml Milch; $\bar{x} \pm s$)	Scheiden- wider- stand (Ohm; $\bar{x} \pm s$)	Trächtig- keits- rate %
	n	%			
Jan.	34	3,3	3,4 $\pm$ 7,1	28,9 $\pm$ 3,9	53,3
Febr.	47	4,5	2,2 $\pm$ 4,4	31,7 $\pm$ 4,9	61,0*
März	52	5,0	0,6 $\pm$ 1,4	28,0 $\pm$ 7,9	65,2*
April	121	11,6	1,5 $\pm$ 3,4	31,3 $\pm$ 5,9	59,4*
Mai	173	16,6	2,6 $\pm$ 4,5	30,2 $\pm$ 4,4	55,8
Juni	134	12,8	1,9 $\pm$ 4,1	33,9 $\pm$ 5,9	51,7
Juli	119	11,4	2,5 $\pm$ 5,1	33,8 $\pm$ 6,5	43,4
Aug.	62	5,9	1,4 $\pm$ 3,0	36,9 $\pm$ 7,2	59,3*
Sept.	90	8,6	2,1 $\pm$ 3,4	33,7 $\pm$ 6,6	49,4
Okt.	99	9,5	1,9 $\pm$ 3,9	32,4 $\pm$ 6,6	55,2
Nov.	88	8,4	2,0 $\pm$ 3,9	33,4 $\pm$ 6,1	55,8
Dez.	25	2,4	2,1 $\pm$ 3,7	31,3 $\pm$ 4,2	72,7*
Gesamt	1044	100	2,0 $\pm$ 4,1	32,5 $\pm$ 6,4	54,9

* = Unterschiede zum Gesamtdurchschnitt signifikant ($P \leq 0,05$; Chi Quadrat-Test)

Vergleicht man die monatlichen Progesteronkonzentrationen untereinander, so sind nur geringe Unterschiede feststellbar.

Kühe mit Progesteronwerten von unter 5,5 ng/ml erreichen eine Trächtigkeitsrate von über 50% (Tab. 21). Umgekehrt ist die Trächtigkeitsrate am niedrigsten (unter 20%), wenn die Progesteronkonzentrationen in der Milch über 10 ng/ml lagen. Zwischen Progesteronkonzentration und Scheidenwiderstand wurde eine signifikante Korrelation festgestellt ($r = 0,7$; $P \leq 0,01$). Der Zusammenhang zwischen Progesteronkonzentration, Scheidenwiderstand und Trächtigkeitsrate ist in Tabelle 22 und 23 dargestellt. Meßwerte von 20 bis 40 Ohm zeigten den optimalen Besamungszeitpunkt an. Bei Meßwerten zwischen 20 und 30 ($n = 384$; 39,7% der Kühe) wurde die höchste Trächtigkeitsrate (über 60%) erreicht. Allerdings wurde am häufigsten, d.h. bei 473 (48,9%) Kühen ein Meßwert zwischen 30 und 40 Ohm registriert und eine Trächtigkeitsrate von 55% erreicht. Die niedrigste Trächtigkeitsrate mit 40% wurde in der Gruppe mit über 40 Ohm gemessen.

Tab. 21: Progesteronkonzentration in der Vollmilch im Verhältnis zur Trächtigkeitsrate

Progesteron- konzentration (ng/ml Milch)	Kühe		Trächtigkeits- rate
	n	%	%
unter 5,5	899	91,8	57,7 ^a
5,5 - 7,5	16	1,6	40,0 ^b
7,5 - 10	15	1,5	42,9 ^b
über 10	49	5,0	16,7 ^b
Gesamt	979	100	55,0

Unterschiede a zu b: $P \leq 0,05$ (Chi Quadrat-Test)

Tab. 22: Scheidenwiderstand im Verhältnis zur Progesteronkonzentration ($\bar{x} \pm s$) und Trächtigkeitsraten

Scheiden- widerstand (Ohm)	Kühe		Progesteron- konzentration (ng/ml Milch)	Trächtigkeits- rate
	n	%		%
unter 20	42	4,3	2,4 $\pm$ 3,9	54,5
20 - 25	63	6,5	1,2 $\pm$ 1,3	64,0
25 - 30	321	33,2	1,4 $\pm$ 2,9	65,0
30 - 35	212	21,9	1,7 $\pm$ 3,3	54,7
35 - 40	261	27,0	1,7 $\pm$ 3,6	51,7
40 - 45	36	3,7	3,7 $\pm$ 6,9	48,3 ^a
über 45	34	3,5	3,3 $\pm$ 6,7	37,0 ^a
Gesamt	966	100	1,7 $\pm$ 3,6	57,0 ^b

Unterschiede a zu b: $P \leq 0,05$ (Chi Quadrat-Test)

Die Intensität der Brunsterscheinungen zeigt, mit Ausnahme des Kriteriums "Uterustonus", einen Zusammenhang mit der Trächtigkeitsrate (Tab. 23). Eine ähnliche Übereinstimmung ist zwischen den Progesteronkonzentrationen und den Brunsterscheinungen gegeben (Tab. 24). Es wurde festgestellt, daß das Verhalten der Progesteronwerte eine gewisse Parallelität zu den Brunstsymptomen Verhalten, Ödematisierung der Vulva und Absonderung von Schleim aufweist. Bei Progesteronkonzentrationen unter 5,5 ng/ml Vollmilch zeigte jeweils die Mehrheit der Tiere bei den einzelnen Brunstsymptomen deutliche Erscheinungen. Im Gegensatz dazu verschob sich das Verhältnis bei Werten über 10 ng/ml dahingehend, daß in der Regel die größere Anzahl der Tiere jeweils nur noch mäßige Symptome in den einzelnen Kategorien zeigte. Kon-

zentrationen zwischen 5,5 und 10 ng/ml Vollmilch deuten einen Wechsel der Erscheinungen in den einzelnen Gruppen von deutlich zu mäßig an. Zwischen Follikelgröße und Brunsterscheinungen läßt sich keine eindeutige Beziehung erkennen. In allen Fällen wurde ein Follikel angebildet (s. Tab. 25). Bemerkenswert ist, daß bei 5 Kühen die Blasen im Verlauf der rektalen Untersuchung abgingen. Diese Kühe wurden trotzdem besamt. Drei davon wurden später bei der rektalen Untersuchung als trächtig befunden.

Tab. 23: Anteil der Trächtigkeitsraten im Verhältnis zu den Brunsterscheinungen

Brunsterscheinungen	Progesteron-Konzentration ^a ng/ml Milch	Scheidenwiderstand ^a Ohm	Trächtigkeitsrate %
Verhalten	n = 893	n = 803	n = 850
I	2,8 + 4,8 (8,5 %)	34,8 + 6,7 (8,0 %)	45,3 (8,8 %)
II	2,2 + 4,5 (38,6 %)	33,3 + 6,4 (36,5 %)	48,5 (38,1 %)
III	1,5 + 3,4 (52,9 %)	31,8 + 6,2 (55,5 %)	62,1* (53,1 %)
Ödematisierung der Vulva	n = 894	n = 804	n = 851
I	3,2 + 5,1 (3,7 %)	35,8 + 7,2 (3,0 %)	33,3 (3,9 %)
II	2,4 + 4,9 (36,5 %)	33,0 + 6,6 (35,1 %)	50,0 (36,0 %)
III	1,5 + 3,3 (59,8 %)	32,1 + 6,3 (61,9 %)	60,2* (60,2 %)
Schleimabsonderung	n = 894	n = 804	n = 851
I	2,2 + 4,4 (10,8 %)	34,6 + 6,5 (10,3 %)	47,4 (11,2 %)
II	2,4 + 4,8 (38,1 %)	33,3 + 6,8 (36,3 %)	49,4 (37,6 %)
III	1,5 + 3,1 (51,1 %)	31,6 + 6,0 (53,4 %)	61,7* (51,2 %)
Uterustonos	n = 870	n = 782	n = 827
I	1,6 + 2,8 (1,2 %)	31,7 + 5,9 (0,8 %)	55,6 (1,1 %)
II	1,9 + 3,7 (47,8 %)	33,2 + 6,5 (49,3 %)	55,9 (48,5 %)
III	1,9 + 4,3 (51,0 %)	32,1 + 6,2 (49,9 %)	50,4 (50,4 %)

* Unterschiede zwischen I und III in der Gruppe sind signifikant $P \leq 0,05$ (Chi Quadrat-Test)

^a $\bar{x} \pm s$

Die Prozentzahlen in Klammern bezeichnen den Anteil der Tiere in den jeweiligen Gruppen

I = nicht, II = mäßig und III = deutlich vorhanden

Tab. 24: Progesteronkonzentration in der Milch im Verhältnis zu den Brunsterscheinungen (%)

Progesteronkonzentration (ng/ml)	Verhalten n = 893			Ödematisierung der Vulva n = 894			Schleimabsonderung n = 894			Uterustonius n = 870		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
unter 5,5	<u>7,2</u>	<u>34,9</u>	<u>50,2</u>	<u>3,0</u>	<u>32,6</u>	<u>56,6</u>	<u>9,8</u>	<u>33,9</u>	<u>48,4</u>	<u>1,0</u>	<u>43,9</u>	<u>47,2</u>
5,5 - 7,5	0,2	0,7	0,6	0,1	0,4	0,9	0,1	0,7	0,7	-	1,0	0,5
7,5 - 10	0,3	0,8	0,4	0,1	0,8	0,6	0,2	0,7	0,7	1,2	0,7	0,7
über 10	0,8	2,2	1,7	0,4	2,7	1,7	0,7	2,8	1,3	-	2,2	2,6
Gesamt % n	8,5 76	38,6 345	52,9 472	3,7 33	36,5 326	59,8 535	10,8 97	38,1 340	51,1 457	1,2 10	47,8 416	51,0 444

== Unterschiede $P \leq 0,05$ (Chi Quadrat-Test)

I = nicht, II = mäßig und III = deutlich vorhanden

Tab. 25: Ovarbefunde im Verhältnis zu den Brunsterscheinungen (Angaben für das Auftreten der "Gelbkörper A, B und C" und der Klassen für den Uterustonius in %)

Follikelgröße* (cm)	Progesteronkonzentration (ng/ml Milch) n = 872	Scheidenwiderstand (Ohm) n = 784	Gelbkörper**			Uterustonius		
			A	B	C	I	II	III
			n = 853			n = 858		
unter 1	2,2 ± 4,8 (20,5%)	33,5 ± 7,3 (20,3%)	17,5	2,3	0,7	0,6	8,4	11,4
1 - 1,5	2,1 ± 4,5 (42,5%)	32,2 ± 6,4 (40,9%)	38,6	3,4	0,2	0,5	16,4	25,8
1,5 - 2	1,4 ± 2,8 (33,0%)	32,6 ± 5,7 (35,0%)	30,6	2,7	-	-	20,8	12,4
über 2	1,7 ± 2,3 (3,9%)	32,0 ± 6,4 (3,8%)	3,6	0,4	-	0,1	2,4	1,2
Gesamt % n	nicht relevant	nicht relevant	90,3 770	8,8 75	0,9 8	1,2 10	48,0 412	50,8 436

I = nicht, II = mäßig und III = deutlich vorhanden

* Follikelgröße geschätzt durch rektale Palpation

** A = kein, B = zweifelhaft, C = deutlicher Gelbkörper palpierbar

Die Zeit der Milchentnahme beziehungsweise Besamung scheint keinen Einfluß auf die Progesteronkonzentrationen und die Intensität der Brunsterscheinungen zu haben (Tab. 26). Im Rahmen dieser Arbeit wurden 73,5% der Besamungen zwischen 8 Uhr und 12 Uhr durchgeführt.

Ein Zusammenhang zwischen Zellgehalt der Milch (Schalm-Test) und Progesteronkonzentration zum Zeitpunkt der Besamung konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Sowohl bei hohem als auch bei niedrigem Zellgehalt entsprach die Verteilung der gemessenen Progesteronwerte dem Durchschnitt der Befunde. Die Differenzen zu den entsprechenden Mittelwerten sind nicht signifikant (Tab. 27).

Tab. 26: Zeitpunkt der Besamung im Verhältnis zu den Brunsterscheinungen

Uhrzeit	Progesteronkonzentration (ng/ml Milch)	Verhalten (Häufigkeit %)			Ödematisierung der Vulva (Häufigkeit %)			Schleimbabsonderung (Häufigkeit %)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
		n = 894			n = 895			n = 895		
8 - 10	2,2 ± 4,9	2,5	11,9	12,9	1,5	10,8	15,0	4,4	9,6	13,3
10 - 12	1,7 ± 3,3	3,4	18,5	25,4**	1,6	17,0	28,6**	4,1	18,6	24,4**
12 - 14	2,4 ± 4,5	1,8	6,3	11,6	0,4	6,3	12,9	1,8	7,7	10,2
14 - 16	2,4 ± 4,9	0,7	1,8	3,1	0,1	2,0	3,5	0,4	1,8	3,4
nach 16	0,9 ± 0,1	0,2	0,1	-	0,1	0,2	-	0,1	0,2	-
Gesamt % n	2,0 ± 4,1	8,5 76	38,6 344	53,0 474	3,7 33	36,3 325	60,0 537	10,8 97	37,9 339	51,3 459

** = Die Unterschiede sind signifikant $P \leq 0,05$ (Chi Quadrat-Test)
I = nicht, II = mäßig und III = deutlich vorhanden

Tab. 27: Schalmtest im Verhältnis zur Progesteronkonzentration

Schalm- Test* (Zellen/ ml Milch)	Kühe		Progesteronkonzentration (ng/ml Milch)				Trächtig- keits- rate %
	n	%	≤5,5	5,5 - 7,5	7,5 - 10	>10	
			Häufigkeitsverteilung je SMT-Reaktion				
-	752	81,7	92,5	1,6	1,6	4,3	55,9
±	51	5,5	90,2	-	-	9,8	49,0
1	108	11,8	88,3	2,7	1,8	7,2	51,9
2 **	9	1,0	90,0	-	-	10,0	44,4
Gesamt	920	100	91,9	1,6	1,6	4,9	54,9

* = nach SCHALM (1960)

** = keine Kuh hatte Reaktion 3

4.11. Kontrolle der Doppelbesamungen

Der Vergleich der Brunsterscheinungen am ersten und zweiten Tag bei Kühen mit sogenannten "Doppelbesamungen" läßt Unterschiede sowohl bei den klinischen Symptomen als auch bei den Impedanzwerten und Progesteronkonzentrationen erkennen (Tab. 28). Die Kühe zeigen am ersten Besamungstag undeutlichere Brunsterscheinungen als am darauffolgenden Tag der "Doppelbesamungen", an dem auch die elektrische Leitfähigkeit des Brunstscheims und die Progesteronkonzentration absinken. Die Unterschiede sollten jedoch vorsichtig interpretiert werden, da die Brunsterscheinungen

subjektiv beurteilt wurden, und die Unterschiede der Progesteronwerte im methodischen Fehlerbereich des Enzygnost^R-Schnelltests liegen (s. Tab. 28 und Tab. 29). Die Progesteronkonzentration war am 2. Tag bei 13 (34,2%) Kühen angestiegen, bei 4 (10,5%) konstant geblieben und bei 21 (55,3%) gefallen.

Tab. 28: Vergleich der Brunsterscheinungen am 1. und 2. Tag bei "Doppelbesamung" (38 Kühe)

Brunsterscheinungen	Besamung					
	Erster Tag			Zweiter Tag		
	I	II	III (Häufigkeit %)	I	II	III
Verhalten	8,3	38,9	52,8*	5,9	26,5	67,7*
Ödematisierung der Vulva	5,6	41,7	52,8*	5,9	23,5	70,6*
Absonderung von Schleim	16,7	38,9	44,4*	8,8	26,5	64,7*
Uterustonus	6,1	48,5	45,5*	-	34,5	65,5*

* = Die Unterschiede zwischen den Klassen III am 1. u. 2. Tag sind signifikant
 $P \leq 0,05$ (Chi Quadrat-Test)

I = nicht, II = mäßig und III = deutlich vorhanden

Tab. 29: Verhältnis der Progesteronkonzentration an den zwei Tagen der "Doppelbesamung":

(a) In Zusammenhang mit der Trächtigkeit

Kriterium	Kühe n %		Progesteronkonzentration (ng/ml Vollmilch; $\bar{x} \pm s$)		Trächtigkeitsrate %
			1. Tag	2. Tag	
steigend	7	18,4	$0,9 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,7$	46,2
	6	15,8	$0,9 \pm 0,8$	$1,7 \pm 1,3$	
konstant	2	5,3	$0,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 1,0$	50,0
	2	5,3	$0,6 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	
fallend	8	21,1	$1,3 \pm 0,8$	$0,6 \pm 0,3$	61,9
	13	34,2	$1,0 \pm 1,0$	$0,7 \pm 0,6$	
Gesamt	17	44,7	$1,1 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,7$	55,3
	21	55,3	$1,0 \pm 0,9$	$1,0 \pm 1,0$	

Differenzen zwischen den Progesteronkonzentrationen am 1. und 2. Tag sind nicht signifikant ($P > 0,05$; t-Test).

(b) In Zusammenhang mit dem Scheidenwiderstand

Kriterium	Kühe A* B*		Progesteronkonzentration (ng/ml Vollmilch; $\bar{x} \pm s$)		Kriterium	Scheidenwiderstand (Ohm) ($\bar{x} \pm s$)	
			1. Tag	2. Tag		1. Tag	2. Tag
steigend	3	-	$0,4 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,5$	steigend	$28,3 \pm 2,9$	$31,3 \pm 1,9$
	2	-	$2,3 \pm 0,0$	$2,5 \pm 0,1$	konstant	$29,0 \pm 1,0$	$29,0 \pm 1,0$
	-	2	$1,4 \pm 1,1$	$1,7 \pm 1,2$		$29,5 \pm 0,5$	$29,0 \pm 0,5$
	3	-	$0,5 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	fallend	$35,3 \pm 2,5$	$33,3 \pm 2,5$
	-	3	$0,5 \pm 0,2$	$1,7 \pm 1,4$		$35,0 \pm 2,2$	$28,7 \pm 2,5$
konstant	2	-	$0,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	konstant	$35,0 \pm 1,0$	$35,0 \pm 1,0$
	-	2	$0,6 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$		$32,0 \pm 2,0$	$32,0 \pm 2,0$
fallend	5	-	$1,2 \pm 0,7$	$0,6 \pm 0,4$	steigend	$30,4 \pm 3,9$	$36,4 \pm 3,2$
	-	2	$0,9 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,1$		$31,5 \pm 2,5$	$37,0 \pm 3,0$
	-	4	$2,2 \pm 1,8$	$1,0 \pm 0,9$	konstant	$30,0 \pm 1,6$	$30,0 \pm 1,6$
	3	-	$1,4 \pm 0,9$	$0,6 \pm 0,2$	fallend	$36,3 \pm 0,5$	$29,7 \pm 4,5$
	-	7	$0,8 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$		$34,7 \pm 6,4$	$29,8 \pm 5,8$

* Die Kühe wurden A = nicht trächtig und B = trächtig.

4.12. Besamung in der Gelbkörperphase

Bei 1044 Routinebesamungen wurden 59 Kühe (5,7%) mit hoher Progesteronkonzentration (über 10 ng/ml Vollmilch) besamt. Alle Kühe waren vor der Besamung klinisch auf pathologische Veränderungen und Zyklusstand untersucht worden. Das bedeutet, daß zum Zeitpunkt der Besamung keine klinischen Symptome festzustellen waren, die diese Besonderheit erklären würden. Erst bei Nachuntersuchungen konnten bei einigen Kühen pathologische Veränderungen festgestellt werden. 32 (54,2%) dieser Kühe wurden mehr als dreimal nachbesamt, 8 (13,6%) davon wurden vor Beendigung der Untersuchung wegen Fruchtbarkeitsstörungen ausgemerzt.

Analysiert man die Ursachen dieser "Fehlbesamungen" anhand der Progesteronbestimmung, so ergibt sich, daß der Radioimmunoassay und der Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltest (Mikrotiterplattenphotometer) eine hohe Progesteronkonzentration ergaben und mit einem Wert von $r = 0,75$ ($P \leq 0,01$) gut korrelierten. Die Auswertung der Progesteronkonzentration durch Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltest (Mikrotiterplattenphotometer) und visuell (direkt) ergab eine Korrelation von $r = 0,9$ ($P \leq 0,01$; $n = 1056$). Keine klinisch bedeutsame Korrelation wurde zwischen Progesteronkonzentration und Scheidenwiderstandswert festgestellt ($r = 0,29$; $P > 0,05$). Aus den ermittelten Progesteronprofilen lassen sich die Phasen der höchsten Progesteronkonzentration (Gelbkörperphase) und die Phasen mit niedrigster Progesteronkonzentration (s. Abb. 8 - 11) erkennen. Berechnet man den Zeitraum zwischen der "Fehlbesamung" und der darauffolgenden Besamung nach Abfall der

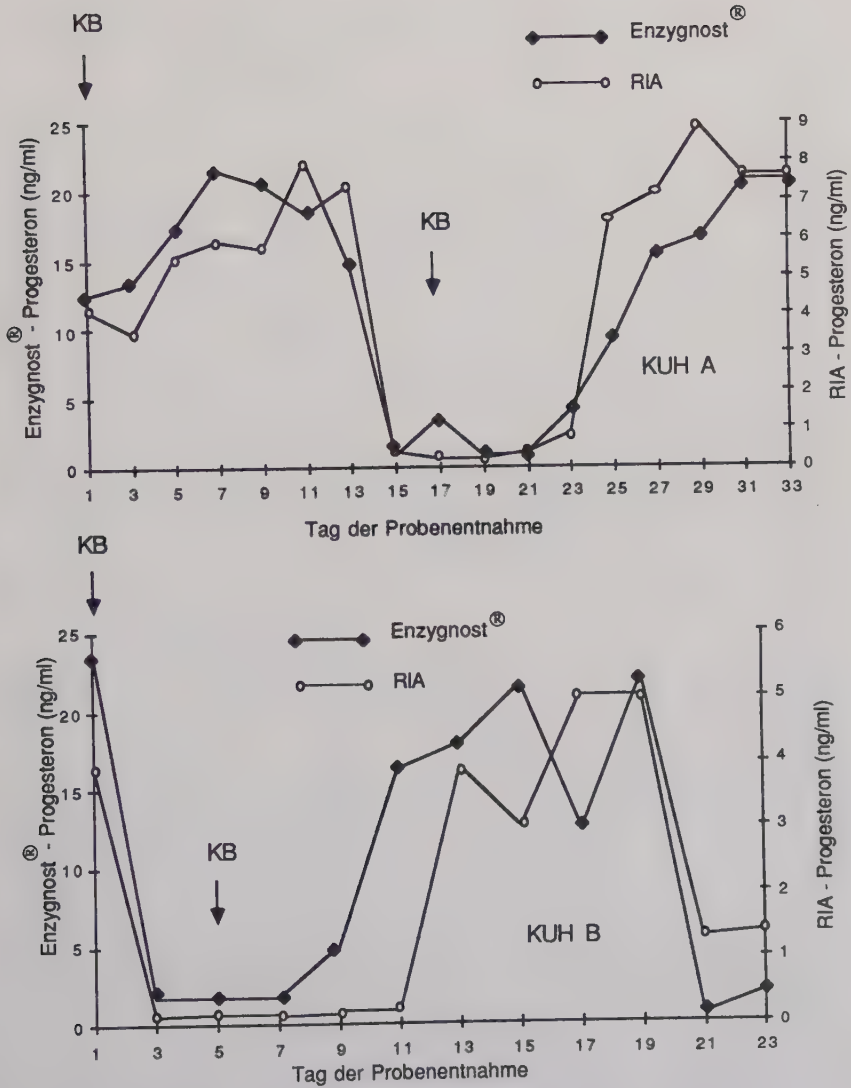


Abb. 8: Beispiel A und B eines Progesteronprofils von 2 Kühen mit einem endokrin aktiven Gelbkörper, brunstähnlichen Symptomen und falschem Zeitpunkt bei der ersten Insemination: A) wurde trächtig nach einer "Folgebeseamung"; B) wurde nicht trächtig nach einer "Folgebeseamung".

Progesteronkonzentration, so ist ein Intervall von $8,7 \pm 5,9$ Tagen festzustellen.

Analysiert man die Ursachen, die eventuell der Grund für die "Fehlbesamungen" sein könnten, zeigt sich, daß das Auftreten von brunstähnlichen Symptomen bei hoher Progesteronkonzentration und das Nichterkennen der Gelbkörperphase den größten Anteil der gesamten "Fehlbesamungen" ausmacht (s. Tab. 30; Abb. 8A und B). Dies schließt auch das Nichterkennen von Ovarialzysten, Frühgraviditäten und Uteruserkrankungen ein (s. Abb. 9A und B; 10A und B). In allen Fällen waren Uterustonus und ein Follikel vorhanden. Die meisten Kühe zeigten mäßig ausgeprägte Brunsterscheinungen mit deutlicher Ödematisierung der Vulva.

Tab. 30: Befunde am Genitale bei "Fehlbesamungen" in der Gelbkörperphase

Befunde	Kühe n	%	Scheiden- widerstand (Ohm; $\bar{x} \pm s$)	Progesteron- konzentration (ng/ml Milch; $\bar{x} \pm s$)
Endometritis	6	10,2	$34,0 \pm 2,5$	$18,5 \pm 5,7$
Gelbkörper- phase	40	67,8	$35,1 \pm 6,3$	$17,2 \pm 5,9$
Ovarialzysten	6	10,2	$30,8 \pm 8,9$	$17,3 \pm 6,7$
Frühträchtig- keit	7	11,8	$40,0 \pm 8,6$	$18,2 \pm 4,2$
Gesamt	59	100	$35,1 \pm 6,9$	$17,3 \pm 5,8$

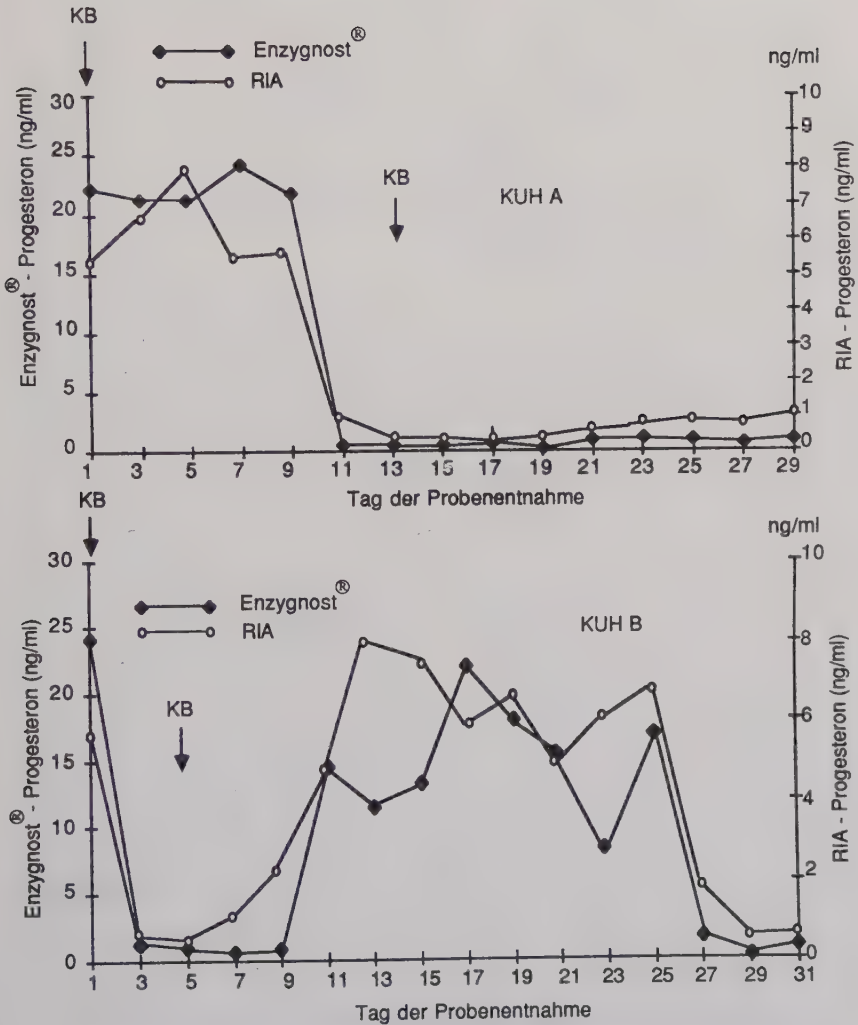


Abb. 9: Beispiel A und B eines Progesteronprofils von 2 Kühen mit Ovarialzysten, die bei hoher Progesteronkonzentration besamt wurden.

Zwischen der Intensität der äußeren Brunstsymptome, dem Scheidenwiderstand und der Progesteronkonzentration war für die "Fehlbesamungen" keine Korrelation zu erkennen (s. Abb. 11). Zum Beispiel zeigte eine der untersuchten Kühe, bei der später IBR/IPV diagnostiziert wurde, stark ausgeprägte brunstähnliche Symptome. Bis zum Progesteronabfall vergingen 35 Tage, was auf einen frühen embryonalen Fruchttod hinweist.

Vergleicht man bei 30 Kühen die Intensität der brunstähnlichen Symptome bei "Fehlbesamungen" und die Brunstsymptome nach Progesteronabfall, stellt man fest, daß 7 (23,3%) Kühe keine Brunstsymptome nach Progesteronabfall zeigten. Die restlichen 23 (76,7%) Kühe zeigten stärker ausgeprägte Brunstsymptome (s. Abb. 11) bei der "Folgebeseamung" als bei den "Fehlbesamungen". Von 23 Kühen, mit stark ausgeprägten Brunstsymptomen wurden 21 nach Progesteronabfall nochmals besamt. 13 (61,9%) wurden trächtig. Kühe ohne ausgeprägte Brunstsymptome (n = 7), mit Ovarialzysten, gleichbleibend hohen Progesteronkonzentrationen, Trächtigkeit oder Endometritiden wurden nicht mehr besamt. Wurde der Zyklusverlauf nach Progesteronabfall bzw. Besamung unmittelbar nach der "Fehlbesamung" kontrolliert, zeigte sich bei 8 von 11 (72,7%) Kühen eine normale Zykluslänge von 18 - 24 Tagen. 3 von 6 (50%) Kühen mit Ovarialzysten zeigten keine Ovulation (s. Abb. 9, Kuh A) und damit eine niedrige Progesteronkonzentration für eine Zeitspanne von über 15 Tagen. 3 von 7 (44,8%) trächtigen Tieren abortierten. Bemerkenswert ist, daß bei einer Kuh die Progesteronkonzentration über 4 Tage nach einem Abort hoch blieb.

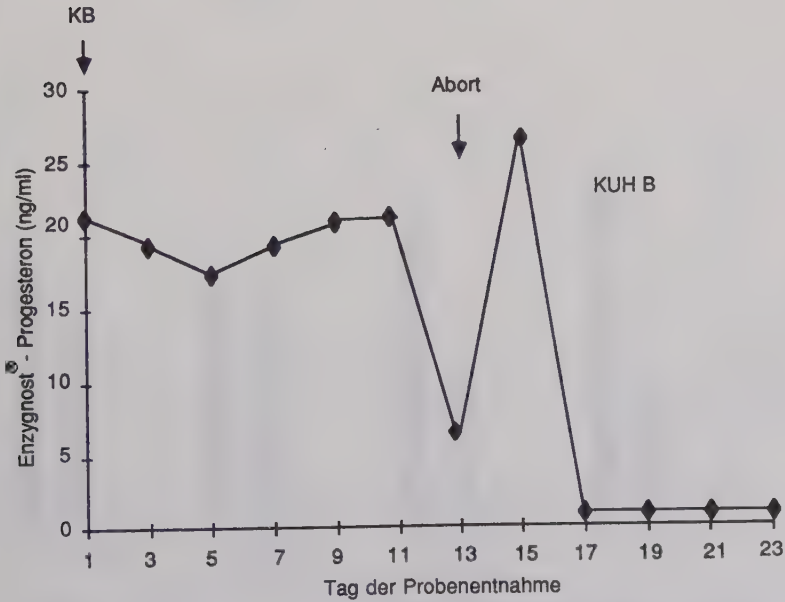
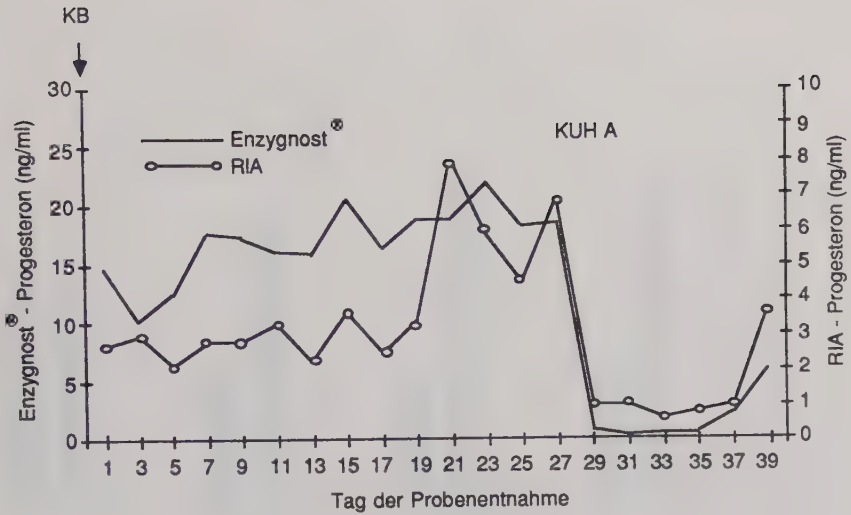


Abb. 10: Beispiel A und B eines Progesteronprofils von 2 Kühen mit endokrin aktivem Gelbkörper und brunstähnlichen Symptomen; A: verlängerter Zyklus, B: Frühträchtigkeit - Abort.

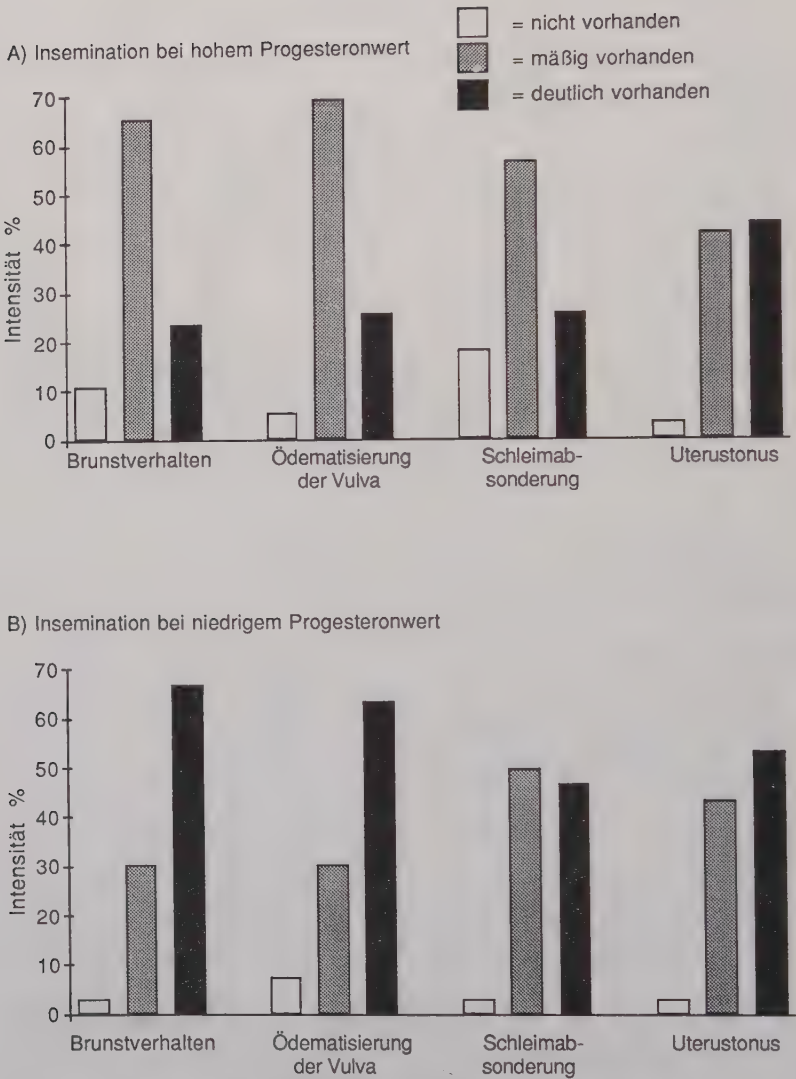


Abb. 11: Vergleichende Darstellung der Intensität der Brunstsymptome bei einer "Fehlbesamung" (hoher Progesteronwert) und Folgebefruchtung (niedriger Progesteronwert).

4.13. Ovarialzysten: Erfassung der Gelbkörperneubildung nach Zystenbehandlung mit Hilfe der Progesteronbestimmung

Am Tag der Zystenbehandlung (rektaler Ovarbefund: Blase mehr als 2,5 cm) zeigten 19 von 22 Kühen eine niedrige Progesteronkonzentration ($0,73 \pm 0,1$ ng/ml Vollmilch). Von den übrigen 3 Kühen lagen keine "Anfangsprogesteronwerte" vor. Die Behandlungen wurden mit dem synthetischen GnRH-Analog Buserelin (5 ml Receptal^R; Fa. Hoechst) oder HCG (5000 I.E.; Ekluton^R, Fa. Vemie) durchgeführt.

Die rektale Kontrolluntersuchung erfolgte 10 bis 14 Tage nach der Behandlung. Nur bei 13 von 22 (52,3%) Kühen wurde klinisch ein Gelbkörper festgestellt. Die Progesteronkonzentrationen betrugen jedoch bei 21 Kühen $22,2 \pm 2,3$ ng/ml Vollmilch, d.h. alle befanden sich im Bereich, der für ein endokrin aktives Corpus luteum spricht. Nur eine Kuh von 9 ohne palpierbaren Gelbkörper zeigte über 25 Tage eine niedrige Progesteronkonzentration.

Der Zeitraum vom Tag der Behandlung bis zum Eintritt der ersten Brunst betrug bei 11 Kühen durchschnittlich $22,8 \pm 4,5$ Tage (Tab. 31). 7 (63,6%) davon wurden nach künstlicher Besamung trächtig.

Bei 10 von 21 Kühen wurde ein Prostaglandin F-2-alpha-Analog (Estrumate^R; Fa. ICI Pharma; Reprodin^R; Fa. Bayer) nach Kontrolluntersuchungen am 10. - 14. Tag eingesetzt. Diese Kühe wurden am 3. Tag nach der Prostaglandinapplikation, abhängig von einer Follikelkontrolle, besamt. Die Zykluslänge bei diesen 10 Kühen betrug $13,0 \pm 1,1$ Tage. 8 (80%) dieser Kühe wurden trächtig.

Tab. 31: Trächtigkeitsrate (TR%) bei Ovarialzysten nach Behandlungskontrolle durch Progesteronbestimmung ($\bar{x} \pm s$)

Therapie- Verfahren (Tag 0)*	Anzahl der Kühe	Progesteronkonzentration (ng/ml Vollmilch)		Zyklus- länge (Tage)	TR% pos.
		Tag 0*	Tag 10 - 14*		
GnRH oder* HCG	11	$0,7 \pm 0,1$	$21,9 \pm 2,9$	$22,8 \pm 4,5^a$	63,6
GnRH	1	0,8	0,7	-	-
GnRH oder HCG + PGF ₂ alpha**	10	$0,7 \pm 0,1$	$20,4 \pm 2,2$	$13,0 \pm 1,1^b$	80,0

Differenz a zu b: $P \leq 0,05$ (t-Test)

* Tag 0 = Tag der Behandlung; Tag 10 - 14 = Tag der Kontrolle

** PGF-2-alpha-Analog (Estrumate^R und Reprodin^R; GnRH oder HCG)

4.14. Brunstvorhersage

Bei 38 Kühen mit Problemen bei der Brunsterkennung wurden Progesteronprofile erstellt, und zwar aus Werten von Milchproben, die im zweitägigen Abstand 10 Tage vor dem erwarteten Brunstbeginn und 10 Tage nach der Besamung gemessen wurden (s. Tab. 32). 8 Kühe zeigten weder Abfall noch Anstieg der Progesteronwerte, sondern blieben über einen Zeitraum von 20 Tagen unter dem Grenzwert von ca. 5,5 ng/ml Vollmilch. Sie wurden als Kühe ohne Ovaraktivität eingestuft. Diese Kühe wurden nicht besamt. 30 Kühe zeigten eine zyklische Ovarfunktion. 3 Tage nach Progesteronabfall unter den Grenzwert (5,5 ng/ml Vollmilch) wurden die Tiere besamt. 12 Kühe wurden trächtig. Bei 18 blieb die Besamung erfolglos.

Tab. 32: Progesteronkonzentrationen von 38 Kühen für die Brunstvorhersage

Tag	Progesteronkonzentration (ng/ml Vollmilch ; $\bar{x} \pm s$)		
	TU pos.* (n = 12)	TU neg.* (n = 18)	Azyklie** (n = 8)
- 10	19,6 $\pm$ 2,8	24,0 $\pm$ 2,0	0,5 $\pm$ 0,2
- 8	18,9 $\pm$ 2,9	22,4 $\pm$ 0,9	0,6 $\pm$ 0,3
- 6	16,5 $\pm$ 2,5	17,7 $\pm$ 4,5	0,3 $\pm$ 0,2
- 4	16,9 $\pm$ 3,2	12,0 $\pm$ 4,9	2,0 $\pm$ 1,8
- 2	1,3 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 1,7	0,6 $\pm$ 0,1
0***	0,6 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1
+ 2	0,7 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 1,9	0,7 $\pm$ 0,3
+ 4	7,9 $\pm$ 3,9	9,2 $\pm$ 4,0	0,6 $\pm$ 0,2
+ 6	15,3 $\pm$ 3,2	11,2 $\pm$ 2,9	0,5 $\pm$ 0,2
+ 8	18,5 $\pm$ 0,8	14,2 $\pm$ 3,0	2,7 $\pm$ 1,0
+ 10	15,9 $\pm$ 0,8	17,1 $\pm$ 4,8	0,6 $\pm$ 0,3

* TU = Trächtigkeitergebnisse, Kuh wurde trächtig (pos.) oder nicht trächtig (neg.)

** Die Kühe wurden nicht besamt

*** Tag 0 = Tag der Besamung

5. DISKUSSION

5.1. Vorversuch

Der Schritt vom Radioimmunoassay zum Enzymimmunoassay hat zur Herstellung von Progesteronschnelltests geführt, die auf unterschiedlichen Verfahren beruhen. Über die Zuverlässigkeit, die Aussagekraft und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Schnelltests liegen bisher noch keine umfangreichen Untersuchungen vor. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst unter Praxisbedingungen einige Schnelltests vergleichend eingesetzt und anschließend Erfahrungen über Brauchbarkeit und Anwendungsbereich des Enzygnost^R-Schnelltests gesammelt.

Das Testsystem Enzygnost^R wurde gewählt, weil die Voruntersuchungen ergaben, daß neben einer für die Praxis geeigneten visuellen Beurteilung auch dem RIA vergleichbare quantitative Aussagen durch photometrische Auswertung zu erhalten sind. Der Intraassay-Variationskoeffizient der Enzygnost^R Milch- und Serumprogesteron-Schnelltests lag für die photometrische Auswertung bei 6,8% und erreichte damit Werte, wie sie auch von STANLEY et al. (1986), THEISSEN (1986) und WORSFOLD et al. (1987) bekanntgegeben wurden. In der Literatur werden generell für die Progesteronbestimmung mit Enzymimmunoassays Intraassay-Variationskoeffizienten von bis zu 10% angegeben (ARNSTADT und CLEERE, 1981; ARNSTADT, 1983; HOEDEMAKER et al., 1984; YASUHARA und KLEEGERG-RUPPERT, 1984; ECKERSALL und HARVEY, 1987; EDWARD ALLEN und PORTER, 1987; OIKAWA et al., 1987). Der Interassay-Variationskoeffi-

zient bleibt mit 16,8% ebenfalls mit den Literaturangaben (1,4% bis 17,9%) vergleichbar (SAUER et al., 1986; STANLEY et al., 1986). Somit ist anhand des Kriteriums "Wiederholbarkeit" die mit dem Enzygnost^R-Schnelltest gemessene Progesteronkonzentration für praktisch-klinische Belange ohne Einschränkung verwendbar.

Erwartungsgemäß ist der Interassay-Variationskoeffizient höher als der Intraassay-Variationskoeffizient. Die zum Teil höheren Interassay-Variationskoeffizienten sind auf nicht standardisierte Faktoren bis zum Ablesen der Farbreaktion zurückzuführen. Die Intensität der Färbung war deutlich von der Umgebungstemperatur und dem Verfallsdatum des Schnelltests abhängig. Derartige Befunde sind bei Enzymverfahren nicht ungewöhnlich, da z.B. die Temperatur bekanntermaßen starken Einfluß auf die Enzymreaktion hat (JOYCE et al., 1977; COLLINS, 1984).

Die zur Überprüfung der Qualität der Antikörperbeschichtung auf den Mikrotiterplatten errechneten Variationskoeffizienten befinden sich im unteren Bereich der von FOULKES et al. (1982a), CLEERE et al. (1985), THEISSEN (1986) und SAUER et al. (1986) angegebenen 2,2% bis 7,9%.

Für die Variabilität bei Doppelbestimmung ergab sich nach THEISSEN (1986) beim Enzygnost^R-Schnelltest ein Wert unter 10%. Aufgrund der eigenen Erfahrungen und der niedrigen Variationskoeffizienten bei Doppelbestimmung werden Einzelbestimmungen mit den Enzygnost^R-Schnelltests im Rahmen der tierärztlichen Praxis als ausreichend angesehen.

Die mit dem Enzygnost^R Milch-Test gemessenen Progesteronkonzentrationen in der Milch von Kühen mit endokrin aktiven Gelbkörpern liegen bei den hier vorgelegten Untersuchungen in der Größenordnung, wie sie von STANLEY et al. (1986), EDDY und CLARK (1987) und EDWARD ALLEN und PORTER (1987) ermittelt wurde. Die Enzygnost^R Serum-Progesteronkonzentration im Blutplasma entspricht den Werten in der Milch. Die bei dem Vergleich der Progesteronkonzentrationen in der Milch und im Blutplasma erzielte Korrelation ($r = 0,98$) belegt, daß der entsprechende Enzygnost^R-Schnelltest in Blutplasma und Milch zu identischen Werten führt. Für klinisch diagnostische Belange kann also sowohl die Milch- als auch die Plasmaprogesteronkonzentration mit dem Schnelltest bestimmt werden. Diese Aussage gilt auch für eine Progesteronkonzentration in der Milch, wenn der Nachweis mit einem Enzygnost^R Serumprogesteron-Test durchgeführt wird und ebenso im Blutplasma bei Einsatz eines Enzygnost^R Milchprogesteron-Schnelltestes. Das heißt, daß in der Praxis Progesteronkonzentrationen in Blut- und Milchproben in einem Ansatz mit einem Testsystem unter Verwendung einer gemeinsamen Standardkurve bestimmt werden können.

Für den Methodenvergleich zwischen Enzymimmunoassay und Radioimmunoassay gibt es verschiedene Literaturangaben. So ermitteln zum Beispiel STANLEY et al. (1986) für den Enzygnost^R Milch-Schnelltest einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,75$ ($n = 1163$). ARNSTADT und CLEERE (1981) fanden bei Hormonost^R einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,98$ ($n = 25$), ECKERSALL und HARVEY (1987) bei Ovucheck^R-Schnelltest eine Korrelation von $r = 0,95$ ($n = 42$), HOEDEMAKER et al. (1984) bei dem klassischen Enzymimmu-

noassay einen Koeffizienten von $r = 0,75$ ($n = 232$) und KÜSTER und HOLTZ (1985) einen von $r = 0,86$ ($n = 30$). Das heißt, der statistisch hochsignifikante Korrelationskoeffizient ($r = 0,75$; $n = 420$) in dieser Arbeit liegt in Bereichen, die den Literaturangaben entsprechen. Die mit Enzygnost^R-Schnelltest ermittelten "Absolutwerte" der Progesteronkonzentrationen lagen ca. dreimal so hoch wie die entsprechenden Werte im Radioimmunoassay.

Die Ursachen für die höhere Progesteronkonzentration des Enzygnost^R-Schnelltestes können unter anderem die monoklonalen Antikörper mit geringen Kreuzreaktionen (FANTL et al., 1981; GAFRE und MILSTEIN, 1981), die "Null" Progesteronstandards (STANLEY et al., 1986; WORSFOLD et al., 1987), die mit Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten oder andere Faktoren sein (SAUER et al., 1982; CLAUS et al., 1985). Es dürfte sich also um einen systembedingten Unterschied handeln. Die Erklärung dafür in unterschiedlichen Rassen, Gesundheit und Haltung der Tiere zu suchen (DONALDSON et al., 1970; HOFFMANN et al., 1977; SCHILLING et al., 1982; KÜSTER und HOLTZ, 1985) ist dagegen unwahrscheinlich.

Zahlreiche Autoren (HOFFMANN und HAMBURGER, 1973; GINTHER et al., 1976; HEAP et al., 1976; PENNINGTON et al., 1976; HOEDEMAKER et al., 1984) fanden eine 3- bis 4-fach höhere Progesteronkonzentration in der Milch als im Blutplasma, da die Milchprogesteronkonzentration ein akkumuliertes Sekretionsprodukt darstellt. Das konnte jedoch in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Eine Erklärung dieses widersprüchlichen Befundes kann im Enzygnost^R-Meßverfahren liegen. Andererseits wird durch die kontinuierlich

verlaufende Milchsekretion ständig neugebildete Milch in das Lumen der Alveolen abgegeben (HEAP et al., 1975; WENDT et al., 1986), wodurch die Progesteronkonzentration im Gesamtgemelk die gleiche bleibt. Vermutlich ist der Einfluß des Residualgemelkes bei sorgfältigem Ausmelken gering.

Aus den in Tabelle 10 und Abbildung 7 ersichtlichen Unterschieden zwischen den mit verschiedenen EIA-Bestimmungsverfahren ermittelten Absolutwerten ergibt sich als praktische Konsequenz die Notwendigkeit, die gemessenen Progesteronkonzentrationen bzw. Schwellenwerte in Zusammenhang mit der entsprechenden Meß- und Auswertungsmethode zu interpretieren. Bei EIA-Schnelltests mit 2 Standards, die nur eine "Ja/Nein"-Aussage ermöglichen, werden Übergangsstufen ausgeklammert und führen so zwangsläufig zu Fehlinterpretationen. Die hohe Zuverlässigkeit des Reprostrip^R-Schnelltests (100 %) ergibt sich auch aus der Verwendung von Tieren, die durch eine klinische Untersuchung bereits vorselektiert waren.

Die unterschiedlichen Verteilungen von Fett und Eiweiß in der Milch und die lipophile Affinität von Progesteron sind für die Variation der Progesteronkonzentration in der Milch verantwortlich (HEAP et al., 1970; CAUDLE et al., 1980; POPE und SWINBURNE, 1980). So ist allgemein bekannt, daß Vor-, Gesamt- und Nachgemelk (MacFARLANE et al., 1977) sowie die einzelnen Euterviertel (McCAUGHEY und GORDON, 1979) und Morgens-, Mittags- und Nachmittagsgemelk (GINTHER et al., 1976; ABDEL-RAHIM et al., 1982) unterschiedliche Fettgehalte und Progesteronkonzentrationen aufweisen

können. Der in der vorliegenden Arbeit gemessene Fettgehalt der Milch ist mit den in der Literatur angegebenen Werten von 2,3% bis 8,4% (im Durchschnitt 3,8%) vergleichbar (WENDT et al., 1986). Es besteht jedoch keine Korrelation zwischen Fettgehalt und Enzygnost^R-Progesteronkonzentration in der Milch. Weiterhin wurden keine Unterschiede zwischen den Progesteronkonzentrationen im Vor-, Gesamt- und Endgemelk, zwischen den Gemelken 3, 6 und 9 Stunden nach Ende des ersten Melkens sowie zwischen den Euter-vierteln bei Vollmilch und Magermilch, gefunden.

Aufgrund dieser Befunde muß angenommen werden, daß sich der Enzygnost^R-Schnelltest nur geringgradig vom Fettgehalt beeinflussen läßt. Dies wurde auch von STANLEY et al. (1986) und WORSFOLD et al. (1987) bereits beobachtet. Die ermittelte relativ große Standardabweichung ist vermutlich ein Ausdruck der tageszeitlich unterschiedlichen Sekretion von Progesteron ins Blut und in die Milch, da die Standardabweichung vom Einzeltier abhängig ist (STABENFELDT et al., 1969; DIAZ et al., 1986).

Es ist bekannt, daß die Veränderung der Milchezusammensetzung durch Mastitiden die Verteilung der Fettkügelchen in der Milch stark verändert (RANDOLPH und ERWIN, 1974; FAYEMI et al., 1980; POPE und SWINBURNE, 1980; ANDERSON et al., 1983; ANDREWS, 1983; LAITINEN, 1986; VINES et al., 1986). Deswegen wirkt sich sowohl das Einfrieren als auch eine längere Lagerung bei ungeeigneter Temperatur negativ auf die Progesteronkonzentration aus (EDOVIST und STABENFELDT, 1980; YASUHARA und KLEEBOG-RUPPERT, 1984; LO-SERT et al., 1986). Daß ein Einfluß des Zellgehaltes auf die

Progesteronkonzentration nach Bestimmung mit dem Enzygnost^R Milch-Schnelltest nicht feststellbar ist, bezieht sich auf folgende Tatsache: Der Enzygnost^R Milch-Test ist, besonders bei gut gemischten Proben, kaum vom MilCHFettgehalt abhängig. Diese Aussage gilt sowohl für eine 48-stündige Lagerung von Milchproben bei einer Raumtemperatur von 20-27° C als auch für das Einfrieren. Die Milchprogesteronkonzentration verändert sich ab ca. 72 Stunden nach der Probenentnahme wie bereits von ANDERSON et al. (1983), YASUHARA und KLEEBOERG-RUPPERT (1984) und LAITINEN (1986) festgestellt wurde.

Die intensive Rotfärbung des Enzygnost^R-Schnelltests, die mindestens bis etwa 48 Stunden nach Testabschluß bestehen bleibt, läßt eine visuelle Auswertung zu. Bei dieser Auswertung ist in den Grenzbereichen der Progesteronkonzentration für endokrin aktive bzw. nicht aktive Corpora lutea eine Fehlerquote von bis zu 10% zu erwarten, da das visuelle Ablesen und Zuordnen der Farbreaktion einer gewissen Übung bedarf und von der subjektiven Einstufung des Untersuchers abhängig ist. Auch HOEDEMAKER und HELD (1985), RATTENBERGER (1985), THEISSEN (1986), STANLEY et al. (1986) und WORSFOLD et al. (1987) setzen eine gewisse Übung für die visuelle Auswertung voraus. Bei einem Vergleich zwischen visuell direkter und visuell "blinder" (d.h. willkürliche Reihenfolge bei codierten Probegläschen) Auswertung der Farbindensität dieses Schnelltestes traten nur äußerst geringe Unterschiede in den Ergebnissen auf, da die Intensität der Färbung bei unterschiedlicher Progesteronkonzentration (1, 5, 10, 30 ng/ml Vollmilch) differenzierbar ist. Als Nachteil bei der visuellen Aus-

wertung wurde jedoch die unterschiedlich schnelle Entwicklung der Farbindensität in Abhängigkeit von der jeweiligen Umgebungstemperatur empfunden.

Eine große Bedeutung kommt der Auswertung mittels Mikrotiterplattenspektrophotometer zu, mit dem die Sicherheit für die diagnostische Interpretation auf 100% ansteigt. Die Bestimmung der Progesteronwerte mit einem Standardphotometer verlangt eine gewisse Übung, insbesondere ein exaktes Pipettieren. Insgesamt lagen die Progesteronkonzentrationen bei diesem Verfahren ca. 10% niedriger als die bei direkter Bestimmung mit einem Mikrotiterplattenphotometer. Da jedoch beide Auswertungsmethoden gut korrelieren ($r = 0,93$; $P \leq 0,01$), sind Standardphotometer in Entwicklungsländern und kleinen Laboratorien wegen der hohen Anschaffungskosten eines Mikrotiterplattenphotometers durchaus verwendbar.

5.2. Feldversuch

Der große Vorteil für den Tierarzt in der Anwendung des Enzygnost^R-Schnelltestes liegt darin, daß das Ergebnis noch innerhalb der Brunstperiode eines Tieres zur Verfügung steht. Das bedeutet, daß genügend Zeit gegeben ist, um den Besamungszeitpunkt abzusichern und eventuell erforderlichen Maßnahmen rechtzeitig durchzuführen.

In Untersuchungen von STANLEY et al. (1986) und WORSFOLD et al. (1987) sowie in vorliegender Arbeit (s. Tab. 21) zeigte sich, daß eine Progesteronkonzentration bis zu 5,5 ng/ml Vollmilch günstige Voraussetzungen für eine erfolgreiche Besamung anzeigt. Demgegenüber sind die Konzeptionschancen bei einer Progesteronkonzentration zwischen 5,5 ng/ml und 7,5 ng/ml Vollmilch wesentlich geringer, obwohl auch in diesen Fällen deutliche Brunsterscheinungen zu beobachten sind (s. Tab. 24). Es muß angenommen werden, daß es sich sowohl um zu frühe als auch um zu späte Besamungen gehandelt haben kann.

Der Bereich der Progesteronkonzentration der für einen günstigen Besamungszeitpunkt spricht, ist groß (0,0 ng/ml bis 5,5 ng/ml Vollmilch). Deshalb ist für die Besamungspraxis zur Erhöhung der Aussagekraft über einen optimalen Inseminationszeitpunkt eine Kombination verschiedener Methoden nötig. Die palpatorischen Befunde des Tierarztes führen nicht immer zu eindeutigen Diagnosen, da Ovarstrukturen fehlinterpretiert werden können (GRUNERT et al., 1985). Zusätzlich ist zu erwähnen, daß gegen Ende des Zyklus noch tastbare Gelbkörper bereits endokrin inaktiv sein können (OKUDA et al., 1984; ROBERTS, 1986). Bei 8,8% der in dieser Arbeit untersuchten Kühe wurde rektal Gelbkörpergewebe diagnostiziert, jedoch durch die Progesteronbestimmung nicht als endokrin aktiv bestätigt.

Die Messung des "Scheidenwiderstandes", d.h. der Impedanz des Zervikalmukus, wurde in dieser Arbeit als eine weitere Methode zur Terminierung des Besamungszeitpunktes verwendet. Die gemessenen Ohmwerte des Scheidenwiderstandes stehen in Übereinstimmung zu den von METZGER et al. (1972), KRIEGER und LEIDL (1974), BOSTEDT et al. (1976) und SCHAMS et al. (1977) veröffentlichten Ergebnissen. Allerdings bestehen bei den Absolutwerten Unterschiede, die jedoch offenbar personen- und gerätebedingt sind. In dieser Arbeit zeigt sich, daß eine zum Zeitpunkt der Besamung gemessene niedrige Progesteronkonzentration im Zusammenhang mit einem niedrigen Scheidenwiderstand steht (s. Tab. 22 - 23). Mit der Kombination beider Methoden sind relativ gute Hinweise auf die Fruchtbarkeitschance einer Insemination zu erhalten. Sowohl allzu niedrige Scheidenwiderstände (unter 20 Ohm) als auch Scheidenwiderstände über 40 Ohm ergaben trotz niedriger Progesteronkonzentration (unter 5,5 ng/ml Vollmilch) durchweg schlechtere Trächtigkeitsraten. Dies wurde bereits in der Literatur beschrieben (LEIDL und STOLLA, 1976; HECKMANN et al., 1979). Die in dieser Arbeit erreichte Trächtigkeitsrate betrug 55,7%. Es ist zu bemerken, daß es sich um keine Non-Return-Rate handelt, sondern die Diagnose trächtig durch einen rektalen Befund gestellt wurde. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß nur ausgewählte Tiere, insbesondere "Problemkühe" in diese Untersuchungen einbezogen wurden.

Die Fehlbesamungen in der Lutealphase bzw. falsche Wahl des Besamungszeitpunktes werden von vielen Autoren (GÜNZLER et al., 1979; SPECKER, 1980; CLAUS et al., 1982; FISCHER-ARNSTADT und ARNSTADT, 1984; LAITINEN et al., 1985) als Ursache für Konzeptionsstörungen bei der künstlichen Besamung aufgeführt. Durch eine Progesteronbestimmung könnten derartige Inseminationen vermieden werden. Es fehlen jedoch derzeit praktikable Maßnahmen, um dieses Problem lösen zu können. Auch die Schnelltests erfordern noch einen zu großen Aufwand, um sie vor jeder Insemination einsetzen zu können.

Die Progesteronkonzentrationen sind, wie allgemein bekannt, während der Lutealphase hoch und während der Brunst niedrig. Die Progesteronbestimmung führte im Rahmen dieser Arbeit zur Feststellung von 5,7% "Fehlbesamungen", die in der Lutealphase durchgeführt wurden. Diese Angaben stimmen mit der in der Literatur angegebenen Häufigkeit von 4 bis 7,7% überein (APPLEYARD und COOK, 1976; OLTNER und EDQVIST, 1981). Nach den Angaben von GÜNZLER et al. (1979), KARG (1981) sowie CLAUS et al. (1982; 1983) liegen sie aber niedriger als die von Problem- (22 - 31%) und Versuchsbetrieben (5,2 - 12,2%). Der Grund für die Unterschiede wird zum Teil durch die zur Besamung vorgestellten Kühe bedingt sein, die entweder aus einer Routinebesamungspraxis stammen oder aus Populationen mit Fruchtbarkeitsproblemen.

Durch die klinische Untersuchung konnten Tiere mit hohen Progesteronkonzentrationen nicht immer erkannt werden. Sie wiesen zum Teil deutliche Brunstsymptome auf. Umgekehrt muß auch eine nied-

rige Progesteronkonzentration mit Brunstsymptomen nicht immer mit einer guten Konzeptionschance gekoppelt sein. Kühe mit Ovarialzysten können, wie wiederholt beschrieben, deutliche Brunstsymptome zeigen. Bemerkenswert ist eine hohe Anzahl von Kühen, die Brunsterscheinungen 1 bis 3 Tage vor dem Progesteronabfall zeigten. Solche Kühe werden zum falschen Zeitpunkt besamt.

Ein besonderer Vorteil der Progesteronbestimmung zeigte sich darin, daß ein Progesteronprofil durch die Untersuchung von Milchproben im Abstand von 2 Tagen erstellt werden kann. Damit lassen sich meist schon nach 4 Proben bzw. 8 Tagen durch den Progesteronverlauf Kühe mit normalen Regelzyklen von solchen mit irregulären Zyklen unterscheiden. Der optimale "Folgebesamungszeitpunkt" solcher Kühe wurde in einigen Fällen allein durch die Progesteronbestimmung ermittelt, da ein Teil der Kühe keine Brunstsymptome zeigte. Die Trächtigkeitsrate bei "Folgebesamungen" war zufriedenstellend. Auf die zuchthygienischen Aspekte des Problemkreises Anaphrodisie wird in diesem Zusammenhang nicht eingegangen.

Eine Zweitbesamung (Doppelbesamung) wurde bei 38 Kühen innerhalb von 24 Stunden nach der ersten Besamung durchgeführt, da die Intensität der Brunsterscheinungen am zweiten Tag deutlicher wurde oder gleich blieb. Im Vergleich zu Tieren, die nur einmal besamt wurden, konnte hiermit keine Erhöhung der Trächtigkeitsrate, wie bereits in vielen Untersuchungen beschrieben, erreicht werden (BO-STEDT et al., 1976; FAHRBACH, 1981). Wurden die Doppelbesamungsergebnisse mit den Progesteronkonzentrationen und den Impedanzwerten

des Zervikalmukus verglichen, so ergab sich, daß bei niedrigeren Progesteronkonzentrationen und Impedanzwerten zum Zeitpunkt der Doppelbesamung, gegenüber der ersten Insemination vor 24 Stunden, bessere Trächtigkeitsraten erzielt werden können (s. Tab. 29). Diese Aussage ist aber wegen der geringen Tierzahl, der Variationsbreite des Scheidenwiderstandswertes von Tier zu Tier und von Messung zu Messung sowie zahlreicher anderer Faktoren, die sich hier auswirken können, nur als Tendenz zu werten (KRIEGER und LEIDL, 1974; LEIDL und STOLLA, 1976; SALISBURY et al., 1978).

Bei der Behandlung der Ovarialzysten des Rindes besteht die Absicht einen neuen regulären Zyklus so früh wie möglich zu induzieren, um damit die Zwischenkalbezeit zu verkürzen (KESLER et al., 1978; STOLLA et al., 1980; NAKAO et al., 1983c; ELMORE, 1986b). Die Progesteronbestimmung in der Milch wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestätigung der Diagnose "endokrin aktives Corpus luteum" und damit zur Verifizierung des Therapieerfolgs als nützlich erachtet. Die rektale Befunderhebung 10 bis 14 Tage nach Zystenbehandlung konnte dadurch abgesichert werden. Eine rektale Palpation zu diesem Zeitpunkt ist oftmals schwierig (LEIDL et al. 1979; NAKAO et al., 1979; WHITMORE et al., 1979; KESLER et al., 1981). Der Abstand zwischen der Zystenbehandlung und der ersten Brunst wurde durch die Applikation von Prostaglandin F-2-alpha-Analoga verkürzt, wie HUMKE et al. (1980), STOLLA et al. (1980), KESLER et al. (1981) und NAKAO et al. (1985) beschrieben haben.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Enzygnost^R-Schnelltests ein einfach anzuwendendes und nützliches Hilfsmittel sind. Es kann damit die Diagnose von endokrin aktiven Gelbkörpern und die Feststellung von Fertilitätsstörungen bei einer Besamung erleichtert werden. Die photometrische Auswertung enzymatischer Reaktionen führt zu Progesteronkonzentrationen, die in ihrer Genauigkeit für klinische Belange den Werten eines Radioimmunoassays gleichkommen. Der größte Vorteil dieser Schnelltests in der Besamungs- und Sterilitätspraxis liegt in der kurzen Zeitspanne zwischen Probenentnahme und Vorliegen der Ergebnisse.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1. Anhand des Enzygnost^R-Tests für Progesteron wurden die Einsatzmöglichkeiten und die Aussagekraft von Enzymimmuno-Schnelltests in der Besamungs- und Sterilitätspraxis des Rindes überprüft.

6.2. Bei 8 Kühen (3 im Diöstrus, 3 trächtig, 2 ohne Zykluser-scheinungen) wurden morgens und abends während der üblichen Melk-zeit an drei aufeinanderfolgenden Tagen Vor-, Gesamt- und Nachge-melksproben entnommen. Das Vorgemelk wurde alternierend täglich einmal 3, 6 oder 9 Stunden nach Beendigung des Morgenmelkens gewonnen. Die Progesteronbestimmung erfolgte durch Enzygnost^R-, Hormonost^R-, Progestassay^R- und Reprostrip^R-Progesteron-schnelltests sowie mittels RIA. Blutproben wurden morgens und abends entnommen. Bei 39 Kühen wurde Vorgemelk aus klinisch gesunden und erkrankten Eutervierteln (Mastitiden) gewonnen. Die Progesteronbestimmung erfolgte mit dem Enzygnost^R-Schnelltest und dem RIA. Es konnte kein wesentlicher Einfluß von Gemelkart, dem Intervall zwischen den Probenentnahmen und dem Zellgehalt (Schalm-Test) auf die Progesteronkonzentration in der Milch fest-gestellt werden.

6.3. Ein Vergleich zwischen den Progesteronschnelltests ergab einen deutlichen Unterschied in den Absolutwerten der Progesteronkonzentrationen ($P \leq 0,05$). Alle Schnelltests lieferten brauchbare Ergebnisse, wenn die gemessenen Progesteronwerte anhand der testspezifischen Schwellenwerte interpretiert wurden. Der Enzygnost^R-Schnelltest gestattet auch eine Auswertung mittels Mikrotiterplattenphotometer (MP). Sie ergab die höchste Genauigkeit. Die mit einem Standardphotometer ermittelten Progesteronwerte lagen ca. 10% unter den mit MP gemessenen Konzentrationen. Die visuelle Auswertung hatte eine Fehlerquote von etwa 10%, da sie einer gewissen Subjektivität bei der Bewertung unterliegt.

6.4. Beim Enzygnost^R-Schnelltest betrug die Intraassayvariation 6,8%, die Interassayvariation 16,8%. Aufgrund der niedrigen Variation bei Doppelbestimmungen und der geringen Unterschiede in den absoluten Progesteronwerten in Milch und Plasma (gemessen durch Enzygnost^R Milch bzw. Serum) sind für die klinische Praxis Einzelbestimmungen von Blut- und/oder Milchproben unter Verwendung einer gemeinsamen Standardkurve möglich.

6.5. Der Enzygnost^R-Schnelltest und die Messung des Scheidenwiderstandes wurden bei 1044 Rinderbesamungen eingesetzt. 5,7% der Kühe wurden in der Lutealphase besamt. Ein Progesteronprofil aus Milchproben, die in zweitägigem Abstand entnommen wurden, ermöglichte die Kontrolle einer "Folgebesamung" nach Progesteronabfall. 13 von 21 wiederholt besamten Kühen wurden trächtig.

6.6. Bei einer Progesteronkonzentration unter dem Schwellenwert von 5,5 ng/ml Vollmilch wurden bei der KB bessere Trächtigkeitsraten erreicht als bei Kühen ab einem Schwellenwert von 7,5 ng/ml Vollmilch. Dies galt auch für Kühe mit deutlichen Brunsterscheinungen.

6.7. Die Progesteronbestimmung wurde weiterhin zur Kontrolle von Zystenbehandlungen, zur Absicherung von "Doppelbesamungen" und zur Brunstvorhersage bei "Problemkühen" für nützlich befunden.

6.8. Mit den Enzymimmunoassay-Schnelltests für Progesteron stehen Verfahren zur Verfügung, die eine Progesteronbestimmung in Milch und Blut für klinische Belange in jeder tierärztlichen Praxis möglich machen.

7. SUMMARY

"Experiences with a rapid testkit for progesterone in insemination programs for cattle"

7.1. The Enzygnost^R rapid testkit was used for the evaluation of the suitability of application and accuracy for rapid enzyme-immunoassay testkits for cattle artificial insemination and sterility practice.

7.2. Milk was obtained from 8 cows at various stages of the reproductive cycle (3 at dioestrus, 3 pregnant and 2 oestrous acyclic) at time of milking. Sampling was for foremilk, bulkmilk and aftermilk. Sampling was also done once daily either 3, 6 or 9 hours after end of morning milking. Rapid testkits (Enzygnost^R, Progestassay^R, Hormonost^R and Reprostrip^R) and RIA were used for the determination of progesterone. Blood plasma was obtained at morning and afternoon milking. The effects of mastitis and high somatic cell counts were evaluated by comparisons of progesterone levels in milk samples of 39 cows obtained from affected and clinically normal quarters. The results provided evidence that neither composition of milk nor time of sampling have effects on progesterone concentration. Thus milk sampling for progesterone determination can be obtained without restrictions at anytime of the day and from any quarter.

7.3. The different testkits were evaluated for accuracy. All provided acceptable results, but differed in progesterone absolute values ($P \leq 0.05$). Greatest accuracy was observed when corresponding discriminatory borderline values for the different testkits were applied. It was also possible to determine progesterone with Enzygnost^R testkit by use of a microtiterplate and a standard spectrophotometer. The microtiterplate spectrophotometer (MP) gave the best results whereas the standard photometer gave values which were 10 % lower than those for MP. An error of up to 10 % was observed for visual evaluation, largely because experience is required for accurate reading of different shades of colours.

7.4. Intraassay and interassay coefficient of variation for Enzygnost^R-testkits were at 6,8 % and 16,8 %, respectively. Since double determinations differed little from single determinations, and that progesterone concentrations in blood and milk after determinations with either milk and serum kits were the same, single determinations for blood and/or milk progesterone using one standard curve are for clinical application adequate.

7.5. Accuracy of 1044 inseminations were evaluated by progesterone testing and measurement of vaginal mucus electrical resistance. 59 (5.7%) cows were inseminated at luteal phase. These cows showed visible estrous symptoms despite a high progesterone concentration. Two-day sampling, starting with day of luteal insemination, provided profiles which were used for prediction of the next oestrus. 13 out of 21 cows which were re-inseminated became pregnant.

7.6. Discriminatory borderline values at 5.5 ng/ml milk gave pregnancy rates of above 50%. Although a discriminatory borderline value of 7.5 ng/ml milk still allowed for vivid oestrous signs, it gave poor pregnancy rates.

7.7. The Enzygnost^R testkit was used to characterize various stages of luteal activity and thus enabled confirmation of double inseminations, control of treatment of ovarian cysts and predicting of oestrus in problem cows.

7.8. Enzymeimmunoassay rapid testkits furnish a suitable and useful method for the determination of progesterone both in blood and milk. They are therefore, suitable for use in clinical practice.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ABDEL-RAHIM, S.E.A., B.G. LOWMAN, D.W. DEAS, F.H. JEFFERY and E.A. HUNTER (1982):
The effect of time of sampling in relation to time of suckling on milk progesterone levels in beef cows.
Br.vet.J. 138, 409-416.
- ALLEN, R.M., M.R. REDSHAW and R.J. HOLDSWOTH (1980):
A comparison of tritiated and iodinated tracers in the radio-immunoassay of progesterone in cow milk.
J.Reprod.Fert. 58, 89-93.
- ANDERSON, K.L., A.R. SMITH, S.L. SPAHR, B.K. GUSTAFSSON, L.E. HIXON, P.G. WESTON, E.H. JASTER, R.D. SHANKS and P.G. WHITMORE (1983):
Influence of the oestrous cycle on selected biochemical and cytological characteristics of milk of cows with sub-clinical mastitis.
Am.J.Vet.Res. 44, 677-680.
- ANDREWS, A.T. (1983):
Breakdown of caseins by proteinases in bovine milks with high somatic cell counts arising from mastitis or infusion with bacterial endotoxin.
J.Dairy Res. 50, 57-66.
- APPLEYARD, W.T. and B. COOK (1976):
The detection of oestrus in dairy cattle.
Vet.Rec. 99, 253-256.
- ARNSTADT, K.I. and W.F. CLEERE (1981):
Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows.
J.Reprod.Fert. 62, 173-180.
- ARNSTADT, K.I., E. GRUNERT und B. SCHULTE (1981):
Die Weiterentwicklung und Anwendung des Enzym-Immuntests (EIA) für Progesteron.
Zuchthyg. 16, 78.
- ARNSTADT, K.I., E. GRUNERT, S. PROKOPP and B. SCHULTE (1982):
Improvement and application of an enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone and its use on blood, milk and saliva samples of cows.
Zbl.Vet.Med.A. 29, 387-394.
- ARNSTADT, K.I. and B. SCHMIDT-ADAMOPOULOU (1982):
Direct enzymeimmunoassay for determination of progesterone in milk from cows.
Br.vet.J. 138, 436-438.
- ARNSTADT, K.I. (1983):
Steroid determination in milk by enzymeimmunoassay.
J.Steroid.Biochem. 19, 423-424.

- ARNSTADT, K.I. und A.R. FISCHER-ARNSTADT (1985a):
Aspekte der Anwendung von Progesteronbestimmungen.
Zuchthyg. 20, 120-121.
- ARNSTADT, K.I. und A.R. FISCHER-ARNSTADT (1985b):
Progesteronbestimmung als Hilfsmittel der Brunstkontrolle.
Tierärztl.Umschau 40, 391-400.
- ARNSTADT, K.I., A. SOBIRAJ und R. SCHEIBNER (1987):
Progesterontests für die Praxis - was sie können, was sie
kosten.
Top agrar 2/87, R24-R26.
- ARTHUR, G.H., D.E. NOAKES and H. PEARSON (1982):
Infertility in the cow.
In: Veterinary Reproduction and Obstetrics, 295-327, 5. Aufla-
ge, Baillière Tindall, UK.
- ASDELL, S. A. (1964):
Patterns of Mammalian Reproduction, 584-603, 2. Auflage, Cornell
University Press, Ithaca.
- AXEN, R., J. PORATH and S. ERNBACH (1967):
Principals of separation.
Nature 214, 1302-1304.
- BALL, P.J.H., D.C. BULMAN and G.E. LAMMING (1980):
Milk progesterone profiles in the diagnosis of non-detected
oestrus in dairy cows and its treatment with Cloprostenol
(Estrumate).
IX.Congr.Intern.Reprod.Anim.Artif.Insem., Madrid, Vol. 3, 26.
- BAMBERG, E., W. STÖCKL, K. ARBEITER, H.S. CHOI und P. MAYER
(1975):
Der Plasmaprogesteron Gehalt bei normozyklischen und graviden
Braunviehkühen.
Wien.tierärztl.Mschr. 62, 130-133.
- BAMBERG, E., H.S. CHOI und E. MÖSTL (1981):
Anwendungsmöglichkeiten der Progesteronbestimmung in der Milch
von Kühen.
Wien.tierärztl.Mschr. 68, 185-187.
- BATRA, S.K., G.S. PAHWA, A.K. SURI und P. PANDEY (1980):
Diurnal variation of progesterone levels in milk and milk-fat
of crossbred cows during the oestrous cycle and early pregnancy.
Anim.Prod. 31, 127-131.
- BARTH, T., J. KRIEGLING, G. SCHÖNE, L. KELKER, L. HERZMANN, A.
HERZMANN und K. GRAESER (1986):
Ergebnisse der Anwendung des Milchprogesterontests zur Kontrolle
des Besamungszeitpunktes und Konzeptionserfolges bei Kühen.
Mh.Vet.Med. 41, 367-371.

- BLAKE, C. and B.J. GOULD (1984):
Use of enzymes in immunoassay techniques.
Analyst 109, 533-547.
- BOOTH, J.M., J. DAVIES and R.J. HOLDWORTH (1979):
Use of the milk progesterone test for pregnancy determination.
Br.vet.J. 135, 478-488.
- BOSTEDT, H., H. BONENGEL, D. GÜNZLER, H. REISSINGER, F. HÖFER
und K. BRUNOLD (1976):
Ovarkontrolle und Messung des elektrischen Widerstandes des
Vaginalsekretes beim Rindern während der Östrus-Periode.
Tierärztl.Umschau 31, 211-215.
- BRAUN, U. (1978):
Der Progesterongehalt im Blutplasma und in der Milch während der
Frühgravidität bei Kühen.
Schweiz.Arch.Tierheilk. 120, 253-261.
- BULMAN, D.C. and G.E. LAMMING (1976):
Radioimmunoassay of progesterone in milk for the diagnosis and
treatment of subfertility in dairy cows.
J.Endocrinology 71, 52P.
- BULMAN, D.C. and G.E. LAMMING (1978):
Milk progesterone levels in relation to conception, repeat
breeding and factors influencing acyclicity in dairy cattle.
J.Reprod.Fert. 54, 447-458.
- BULMAN, D.C. and G.E. LAMMING (1979):
The use of milk progesterone analysis in the study of oestrus
detection, herd fertility and embryonic mortality in dairy cows.
Br.vet.J. 135, 559-567.
- CAUDLE, A.B., T. CLEKIS, F.N. THOMSON and S.D. VAN-CAMP (1980):
Progesterone in bovine milk fat.
Theriogenology 14, 329-338.
- CAVESTANY, D. and R.H. FOOTE (1985):
The use of milk progesterone and electronic vaginal probes as
aids in large dairy herd reproductive management.
Cornell Vet. 75, 441-453.
- CHANG, C.F. and V.L. ESTERGREEN (1983):
Development of a direct enzyme immunoassay of milk progesterone
and its application to pregnancy diagnosis.
J.Anim.Sci. 57, Suppl. 1, 323 (Abstr. 464).
- CHANG, C.F. and V.L. ESTERGREEN (1984):
A direct and simplified enzyme immunoassay of milk proge-
sterone for pregnancy diagnosis in cows.
J.Anim.Sci. 59, Suppl. 1, 366 (Abstr. 538).
- CLAUS, R. and E. RATTENBERGER (1979):
Improved method for progesterone determination in milk fat.
Br.vet.J., 135, 464-469.

- CLAUS, R., H. KARG, E. RATTENBERGER und F. PIRCHNER (1982):
Analyse von Fortpflanzungsproblemen bei Kühen mit Hilfe der
Progesteronbestimmung im Milchfett. II: Ursachen erfolgloser
Besamungen.
Zuchthyg. 17, 203-213.
- CLAUS, R., H. KARG, D. ZWIAUER, I. von BUTLER, F. PIRCHNER and
E. RATTENBERGER (1983):
Analysis of factors influencing reproductive performance of
the dairy cows by progesterone assay in milk fat.
Br.vet.J. 39, 29-37.
- CLAUS, R. und S. HAUG (1984):
Theorie und Praxis des Milchprogesterontests.
Tierzüchter 36, 244-246.
- CLAUS, R., E. MÜNSTER und M. DEHNHARD (1985):
Überprüfung der Anwendbarkeit eines Mikrotiter-Enzymimmuntests
für Nachgemelk zur Fruchtbarkeitsanalyse bei der Kuh.
Zuchthyg. 20, 54-60.
- CLEERE, W.F., J.P. GOSLING, M.C. MORRIS, M.F. CHARLETON,
B.T. MOLONEY, P.F. FOTRELL and J.M. SCREENAN (1985):
A high performance, high throughput enzymeimmunoassay for the
analysis of progesterone in plasma or milk.
Ir.vet.J. 39, 6-14.
- COLLINS, W.P. (1984):
Selected bibliography on immunoassay developments.
Bibl.Reprod. 44, A1-A8.
- COX, N.M.; F.N. THOMPSON and D.H. CULVER (1978):
Milk progesterone to predict reproductive status in a commercial
dairy herd.
J.Dairy Sci. 61, 1616-1621.
- DARLING, J.A.B., A.H. LAING and B. HARKNESS (1974):
A survey of the steroids in cow milk.
J.Endocr. 62, 291-297.
- DAVIES, J. and N.A. FLETCHER (1987):
Evaluation of an enzyme immunoassay for the qualitative
assessment of progesterone in bovine blood.
Vet.Rec. 120, 257-258.
- DIAZ, T., M. MANZO, J. TROCONIZ, N. BENACCHIO and O. VERDE
(1986):
Plasma progesterone levels during the estrous cycle of Holstein
and Brahman cows, carora type and cross-breed heifers.
Theriogenology 26, 419-432.
- DOBSON, H., S.E. MIDMER and R.J. FITZPATRICK (1975):
Relationship between progesterone concentrations in milk and
plasma during the bovine oestrous cycle.
Vet.Rec. 96, 222-223.

- DOBSON, H. and R.J. FITZPATRICK (1976):
Clinical application of the progesterone-in-milk test.
Br.vet.J. 132, 538-550.
- DÖBELI, M. and K. ZEROBIN (1984):
Trächtigkeitsdiagnose bei Kühen anhand dreimaliger Progesteronbestimmungen in der Milch.
Schweiz.Arch.Tierheilk. 126, 399-407.
- DONALD, H.P. (1943):
Heat during pregnancy in dairy cows.
Vet.Rec. 55, 297-298.
- DONALDSON, L.E., J.H. BASSET and G.D. THORBURN (1970):
Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycle, pregnancy and lactation and the effects of undernutrition and exogenous oxytocin on progesterone concentration.
J.Endocrinology 48, 559-614.
- DONOHO, H.R. and H.E. RICKARD (1955):
The occurrence of estrus during pregnancy in several Holstein Herds.
J.Dairy Sci. 38, 602. P8.
- DRAY, F., J.M. ANDRIEU and F. RENAUD (1975):
Enzymeimmunoassay of progesterone at the picogram level using β -Galactosidase as label.
Biochim.Biophys.Acta 403, 131-138.
- DREW, B. (1986):
Milk progesterone testing as an aid to cow fertility management.
In Practise 8, 17-20.
- EASTMAN, S.A.K. (1979):
Methods of improving the accuracy of positive results from milk progesterone pregnancy testing.
Br.vet.J. 135, 489-490.
- ECKERSALL, P.D. and M.J.A. HARVEY (1987):
The use of a bovine plasma progesterone ELISA kit to measure progesterone in equine, ovine and canine plasmas.
Vet.Rec. 120, 5-8.
- EDDY, R.G. and P.J. CLARK (1987):
Oestrus prediction in dairy cows using an ELISA progesterone test.
Vet.Rec. 120, 31-34
- EDQVIST, L. and G.H. STABENFELDT (1980):
Reproductive hormones.
In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 513-544,
3. Auflage, Ed.: J.J. Kaneko, Academic Press, New York.

- EDWARD ALLEN, W. and D.J. PORTER (1987):
Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunoassay
for the measurement of progesterone in equine plasma and milk.
Vet.Rec. 120, 429-431.
- ELLIS, S.T., R.B. HEAP, F. PARIS, C.J. STANLEY and A.E. WEBB
(1986):
A rapid enzyme amplified immunoassay for progesterone in bovine
milk using a monoclonal antibody.
J.Physiol. 371, 2P.
- ELMORE, R.G. (1986a):
Rapid progesterone assays: The latest in kit technology.
Vet.Med. 81, 659-662.
- ELMORE, R.G. (1986b):
Bovine ovarian cysts.
In: Current veterinary therapy. 2; Food animal practise,
779-781, Ed.: J.L. Howard, W.B. Saunders Company, Philadel-
phia.
- ERB, R.E. and R.A. MORRISON (1958):
Estrus after conception in a herd of Holstein-Friesian cattle.
J.Dairy Sci. 61, 267-274.
- FAHRBACH, H. (1981):
Einfluß der Doppelbesamung beim Rind auf das Besamungsergebnis
unter Praxisbedingungen.
Vet.med.Diss., München.
- FANTL, V.E., D.Y. WANG and A.S. WHITEHEAD (1981):
Production and characterisation of a monoclonal antibody to
progesterone.
J.Steroid Biochem. 14, 405-407.
- FAYEMI, E., H.O. HOLMBERG and R.K. GUSTAFSSON (1980):
Bacterial and somatic cell count and progesterone concentration
of milk from cows with subclinical mastitis as related to stage
of the oestrous cycle.
IX.Congr.Intern.Reprod.Anim.Artif.Insem. Madrid, Vol. III, 215.
- FAYEMI, E., H.O. HOLMBERG and R.K. GUSTAFSSON (1982):
In vitro investigation on the possible effect of mastitic bacte-
ria on milk progesterone concentration.
Zbl.Vet.Med.B. 29, 477-482.
- FEKRY, H. und S. KLEEBOEG-RUPPERT (1985):
Progesteronbestimmung in Büffelmilch mit Hilfe des Enzymimmuno-
assays (EIA).
Zuchthyg. 20, 121.
- FISCHER-ARNSTADT, A.R. und K.I. ARNSTADT (1984):
Erfahrungen mit dem Progesteronservice an der Besamungsstation
Herbertingen.
Tierzüchter 36, 247-248.

- FOOTE, R.H. (1975):
Estrus detection and estrus detection aids.
J.Dairy Sci. 58, 248-256.
- FOOTE, R.H., E.A.B. OLTENACU, H.L. KUMMERFELD, R.D. SMITH,
P.M. RIEK and K. BRAUN (1979):
Milk progesterone as a diagnostic aid.
Br.vet.J. 135, 550-558.
- FOOTE, R.H., P.C. LADD and N.A. LAFAUNCE (1982):
Milk progesterone concentration in superovulated cows.
Theriogenology 17, 89.
- FOULKES, J.A., A.D. COOKSON and M.J. SAUER (1982a):
Artificial insemination in cattle based on daily microtitre
plate enzymeimmunoassay of progesterone in whole milk.
Br.vet.J. 138, 515-521.
- FOULKES, J.A., M.J. SAUER and A.D. COOKSON (1982b):
Developments in microtitre plate enzyme immunoassay for progesterone in whole milk.
J.Steroid Biochem. 17, 168.
- GALFRE, G. and C. MILSTEIN (1981):
Production and characterisation of a monoclonal antibody to progesterone.
J.Steroid Biochem. 14, 405-407.
- GERSTMAN, B.B. and D.T. CAPPUCCI (1986):
Evaluating the reliability of diagnostic test results.
J.Am.Vet.Med.Ass. 188, 248-251.
- GINTHER, O.J., L.C. NUTI, M.C. GARCIA, B.C. WENTWORTH and W.J. TYLER (1976):
Factors affecting progesterone concentration in cow's milk and dairy products.
J.Anim.Sci. 42, 155-159.
- GODKE, R. A., R.H. INGRAHAM and L.F. ARCHIBALD (1979):
Plasma progesterone levels for diagnosis of anoestrous beef cattle prior to PGF 2 alpha treatment.
Theriogenology 11, 98.
- GORDON, I. (1983):
Introduction to controlled breeding in cattle.
In: Contolled breeding in farm animals, 5-24, Ed.: I. Gordon, Pergamon Press, Oxford.
- GOWAN, E.W. and R.J. ETCHES (1979):
A solid-phase radioimmunoassay for progesterone and its application to pregnancy diagnosis in the cow.
Theriogenology 12, 327-343.

GRUNERT, E., E. SCHALLENBERGER, M. QUACK, D. GRUNERT und H. KARG (1985):

Die Anwendung des Milchprogesterontests zur Überprüfung klinischer Diagnosen sowie zur Kontrolle der Effektivität tierärztlicher Maßnahmen in der Sterilitätspraxis beim Rind.

Tierärztl.Umschau 40, 639-651.

GÜNZLER, O., L. KORNDORFER, H. LOHOFF, R. HAMBURGER und B. HOFFMANN (1975):

Praktische Erfahrungen mit der Progesteronbestimmung in der Milch zur Erfassung des Fertilitätszustandes bei der Kuh.

Tierärztl.Umschau 30, 111-118.

GÜNZLER, O., E. RATTENBERGER, A. GÖRLACH, R. HAHN, P. HOCKE, R. CLAUS und H. KARG (1979):

Milk progesterone determination as applied to the confirmation of oestrus, the detection of cycling and as an aid to veterinary and biotechnical measures in cows.

Br.vet.J. 135, 541-549.

GÜNZLER, O., S. MÜLLER, R. CLAUS, H. KARG und F. PIRCHNER (1982):

Analyse von Fortpflanzungsproblemen bei Kühen mit Hilfe der Progesteronbestimmung im MilCHFett. 1: Methodik und Interpretation anomaler Progesteron von Verlaufskurven im Zusammenhang mit klinischen Befunden.

Zuchthyg. 17, 193-202.

HAMBURGER, R. (1974):

Progesteronbestimmung in der Milch.

Vet.med.Diss., München.

HANSEL, W. (1959):

The oestrous cycle of the cow.

In: Reproduction in domestic animals, 223-265, Eds.: H.H. Cole and P.T. Cupps, Academic Press, London.

HANSEL, W. (1981):

Plasma hormone concentrations associated with early embryo mortality in heifers.

J.Reprod.Fert., Suppl. 30, 231-239.

HASLER, J.F., R.A. BOWEN, L.D. NELSON and G.E. SEIDEL (1980):

Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers.

J.Reprod.Fert. 58, 71-77.

HAUG, S. und R. CLAUS (1983):

Erste Erfahrungen zum Nachweis von Fehlbesamungen durch Progesteronbestimmung am Tag 0 und Tag 1 (0/1 Test).

Zuchthyg. 18, 210-215.

HAUKE, H. (1965):

Chemische und physikalische Untersuchungsmethoden.

In: Tierärztliche Milchuntersuchung (Ausgewählte Kontrollmethoden für das milchhygienische Laboratorium), 233-260, Ed.: W. Schönherr, S. Hirzel Verlag, Leipzig.

- HEAP, R.B., J.L. LINZELL and C.R. SOLTI (1969):
Quantitative measurement of progesterone metabolism in the
mammary gland of the goat.
J.Physiol. 200, 38P-40P.
- HEAP, R.B., A.M. SYMONS and J.C. WATKINS (1970):
Steroids and their interactions with phospholipids, solubility,
distribution coefficient and effect on potassium permeability
of liposomes.
Biochim.Biophys. Acta 218, 482-495.
- HEAP, R.B., M. GWYN, J.A. LAING and D.E. WALTERS (1973):
Pregnancy diagnosis in the cow; changes in milk progesterone
concentration during the oestrous cycle and pregnancy measured
by rapid radioimmunoassay.
J.Agric.Sci.Camb. 81, 151-157.
- HEAP, R.B., J.L. LINZELL and L.A. LAING (1974):
Pregnancy diagnosis in cows: Use of progestagen concentration
in milk.
Vet.Rec. 94, 160.
- HEAP, R.B., A. HENVILLE and J.L. LINZELL (1975):
Metabolic clearance rate, production rate, and mammary uptake
and metabolism of progesterone in cows.
J.Endocrinology 66, 239-247.
- HEAP, R.B., R.J. HOLDSWORTH, J.E. GABSBY, J.A. LAING and
D.E. WALTERS (1976):
Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone
concentration.
Br.vet.J. 132, 445-464.
- HECKMAN, G.S., L.S. KATZ, R.H. FOOTE, E.A.B. OLTENACU, N.R. SCOTT
and R.A. MARSCHALL (1979):
Estrous cycle patterns in cattle monitored by electrical resis-
tance and milk progesterone.
J.Dairy Sci. 62, 64-68.
- HEINONEN, K.M., M. ALANKO and J. LAITINEN (1982):
Relationship between clinical findings in the ovary and milk
progesterone levels.
Proc.14th Nordic Vet. Congr. (Copenhagen), 445.
- HIMSTEDT, R., H. BOSTEDT und O. GÜNZLER (1984):
Zum Ablauf der Periode post abortum bei Rind - klinische Erhe-
bungen und Messungen der Progesteronkonzentration in der Milch.
Zuchthyg. 19, 112-113.
- HOAGLAND, T.A. and M.A. BARNES (1984):
Serum and milk progesterone in Synchron-mate-B treated postpartum
beef cows.
Theriogenology 22, 247-258.
- HOCKE, P. und R. HAHN (1983):
Stimmt der Besamungszeitpunkt ?
Zuchtwahl und Besamung 101, 17-19.

HOEDEMAKER, M. (1982):

Einfluß von Störungen der Eutergesundheit auf den radio- und enzymimmunologisch bestimmten Progesterongehalt im Milchfett und in der Milch von Kühen.
Vet.med.Diss., Hannover.

HOEDEMAKER, M., K.I. ARNSTADT und E. GRUNERT (1984):

Bestimmung von Progesteron in bovinen Blut- und Milchproben mit Hilfe verschiedener Methoden des Radio- und Enzymimmuntests.
Zbl.Vet.Med.A. 31, 105-118.

HOEDEMAKER, M. und E. GRUNERT (1984):

Untersuchungen über den Einfluß der chronischen katarrhalischen Mastitis auf den Progesterongehalt im Milchfett und in der Milch von Kühen.
Mh.Vet.Med. 39, 410-415.

HOEDEMAKER, M. und Th. HELD (1985):

Progesteronbestimmung in der Milch und im Blutserum von Kühen mit einem Enzymimmuntest ohne vorherige Extraktion auf Mikrotiterplatten und -teststreifen.
Prakt.Tierarzt 66, 878-884.

HOFFMANN, B. und R. HAMBURGER (1973):

Progesteron in der Milch: Radioimmunologische Bestimmung, Beziehung zur Gelbkörperfunktion und Milchfettkonzentration.
Zuchthyg. 8, 154-162.

HOFFMANN, B., M.L. KYREIN and M.L. ENDER (1973):

An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma.
Hormone Res. 4, 302-310.

HOFFMANN, B. (1974):

Fruchtbarkeitskontrolle beim Rind mittels Progesteronbestimmung in der Milch.
Tierzüchter 26, 291-293.

HOFFMANN, B., R. HAMBURGER, O. GÜNZLER, L. KORNDÖRFER and H. LOHOFF (1974):

Determination of progesterone in milk applied for pregnancy diagnosis in the cow.
Theriogenology 2, 21-28.

HOFFMANN, B., O. GÜNZLER, R. HAMBURGER and W. SCHMIDT (1976):

Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle; methodological approaches and present status of application in Germany.
Br.vet.J. 132, 469-476.

HOFFMANN, B. (1977):

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind. Entwicklung von Meßverfahren und physiologische Daten.
In: Fortschritte der Veterinärmedizin, Beihefte zum Zentralblatt für Veterinärmedizin, 39-60, Heft 26, Verlag Paul Parey, Berlin.

- HOFFMANN, B., R. HAMBURGER und W. HOLWICH (1977):
Bestimmung von Progesteron direkt in MilCHFett als verbessertes
Verfahren zur Fertilitätskontrolle bei der Kuh.
Zuchthyg. 12, 1-7.
- HOFFMANN, B., J. SCHMIDT and E. SCHALLENBERGER (1979):
Hormonal mechanisms involved in control of parturition in the
cow.
In: Calving problems and early viability of the calf. Current
Topics in Vet. Med., 263-281, Eds.: B. Hoffmann and B. Mason,
Martinus Nijhofs, The Hague.
- HOLDSWORTH, R.J., J.M. BOOTH, G.A.M. SHARMANN and E.A.S. RATTRAY
(1980):
Measurement of progesterone levels in whole and fore-milk
from dairy cows.
Br.vet.J. 136, 546-554.
- HOLTZ, W., A. v.BRACKEL und J. KÜSTER (1986):
Der Milchprogesterontest: Instrument zur Fruchtbarkeitspflege
beim Rind.
J.Vet.Med.A. 33, 321-336.
- HRUSKA, A.K. and Z. VERZNIK (1983):
Significance of progesterone determination in milk.
Endocr.Expt. 17, 207-211.
- HRUSKA, A.K. (1984):
Die Anwendung des Milchprogesterontests in Verbindung mit der
Computertechnik in der Organisation der Zuchthygienischen Arbeit
beim Rind.
Tierhyg.Information, Sonderheft 16, 36-42.
- HUMKE, R., W. BENTELE and U. HÜGEL (1980):
Practical tests into the use of LH-FSH-releasing hormones in
treating follicular cysts in cattle.
11th Intern.Congr.Diseases of Cattle, Israel, Vol. 2, 1112-1122
- HUNTER, W.M. (1978):
Radioimmunoassay.
In: Handbook of Experimental Immunology, Ed.: D.M. Weir,
Blackwell Oxford. UK.
- INAUDI, P., M. BACIGALUPO, C. MONITTOLA, G. LUGARO and A.R.
GENAZZANI (1982):
Pregnancy diagnosis in cattle by a rapid and highly reliable
method of progesterone determination in milk.
J.Reprod.Fert. 65, 265-273.
- IRVIN, H.J., R.D. RANDEL, W.E. HAENSLY and A.M. Jr. SORESENSEN
(1978):
Reproductive studies of Brahman cattle. III. Comparison of
weight, progesterone content, histological characteristics
and 3 β -hydroxy-steroid dehydrogenase activity in Corpora lutea
of Brahman, Herford and Brahman X Herford heifers.
Theriogenology 10, 417-427.

JOHANSSON, A., C.J. STANLEY and C.H. SELF (1985):

A fast highly sensitive calorimetric enzyme immunoassay system demonstrating benefits of enzyme amplification in clinical chemistry.

Clin.Chim.Acta 148, 119-124.

JOYCE, B., G.F. READ and D. R. FAHMY (1977):

A specific enzymeimmunoassay for progesterone in plasma.

Steroids 29, 761-770.

JOYCE, B., A.H. OTHIK, G.F. READ and D. RIAD-FAHMY (1981):

A sensitive specific solid-phase enzyme immunoassay for plasma progesterone.

Ann.Clin.Biochem. 18, 42-47.

JÜCHLE, W. and D.R. LAMOND (1980):

Physiology of reproduction.

In: Control of reproduction functions in domestic animals, 14-60, 1. Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

KAMONPATANA, M., D.F.M. VAN DE WIEL, W. KOOPS, D. LEENANURUKSA, C. NGRAMSURIYAROJ and S. USANAKORNHUL (1979):

Oestrus control and early pregnancy diagnosis in the swamp buffalo: Comparison of enzymeimmunoassay and radioimmunoassay for plasma progesterone.

Theriogenology 11, 399-409.

KARG, H. (1981):

Physiological impact on fertility in cattle, with special emphasis on assessment of the reproductive function by progesterone assay.

Livest.Prod.Sci. 8, 233-246.

KARG, H. (1985):

Neue Dimensionen der Endokrinologie und ihre Bedeutung für die Tierproduktion.

Prakt.Tierarzt 66, 103-113.

KESLER, D.J., H.A. GARVERICK, A.B. CAUDLE, R.G. ELMORE and S. YOUNGQVIST (1978):

Clinical and endocrine responses of dairy cows with ovarian cysts to GnRH and PGF2 alpha.

J.Anim.Sci. 46, 719-725.

KESLER, D.J., R.G. ELMORE, E.M. BROWN and H.A. GARVERICK (1981):

Gonotropin releasing hormone treatment of dairy cows with ovarian cysts. 1. Gross ovarian morphology and endocrinology.

Theriogenology 16, 207-217.

KÖRBER, A. (1985):

Systematische Einflüsse auf die Erstbesamungsergebnisse beim Deutschen Fleckvieh unter besonderer Berücksichtigung des Besamungszeitpunktes und des Besamungstechnikers (Besamungsgebietes)

Vet.med.Diss., München.

- KÖRBER, A., O. DISTL, H. KRAUßLICH, P. HOCKE und R. HAHN (1986):
Analyse der Besamungsergebnisse aus drei Technikergebieten des
Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch mit Hilfe des Progesteron-
tests.
Zuchthyg. 21, 97-104.
- KOPPINEN, J., T. LEINO and M. ALANKO (1984):
Ovarian cysts in dairy cattle: Observations of symptoms and
milk progesterone values: Therapy with GnRH and a combination
of GnRH and Prostaglandin.
Nord.Vet.Med. 36, 361-366.
- KOZICKI, I.E., H. BOSTEDT, K.I. ARNSTADT und H. FINGER (1982):
Einsatz des Enzym-Immunotestes zur Ermittlung von postpartalen
Progesteronprofilen bei Milchkühen unter verschiedenen Hal-
tungsbedingungen.
Zuchthyg. 17, 98-99.
- KRIEGER, H. und W. LEIDL (1974):
Praxiserfahrungen mit der Messung des elektrischen Widerstandes
von Vaginialschleim beim Rind als Hilfsmittel bei der Östrus-
diagnose.
Tierärztl.Umschau 29, 22-25.
- KÜSTER, J. und W. HOLTZ (1985):
Progesteronbestimmung in Kuhmilch: Vergleich der Ergebnisse des
Radioimmunoassay MilCHFett- und Enzymeimmunoassay Direkt-Tests
sowie eine Qualitätskontrolle des Enzymeimmunoassay Direkt-
tests.
Zuchthyg. 20, 34-40.
- LAING, J.A. and R.B. HEAP (1971):
The concentration of progesterone in milk of cows during the
reproductive cycle.
Br.vet.J. 127, (XIX-XXII).
- LAITINEN, J., E. REMES, M. TENHUNEN, O. HÄNNINEN and M. ALANKO
(1985):
Milk progesterone in Finnish dairy cows: A field study of the
control of Artificial Insemination and early pregnancy.
Br.vet.J. 141, 297-307.
- LAITINEN, J.T. (1986):
Levels and distribution of progesterone in Bovine milk: effects
of mastitis and milk composition.
Br.vet.J. 142, 562-568.
- LAMMING, G.E. and D.C. BULMAN (1976):
The use of milk progesterone radioimmunoassay in the diagnosis
and treatment of subfertility in dairy cows.
Br.vet.J. 132, 507-517.
- LEIDL, W. (1963):
Domestikation und Fruchtbarkeit.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 70, 396-398.

- LEIDL, W. und H. VAUPEL (1973):
Methoden der Brunsterkennung beim Rind.
Tierzüchter 25, 13-14.
- LEIDL, W. and R. STOLLA (1976):
Measurement of electrical resistance of the vaginal mucus as an aid for heat detection.
Theriogenology 6, 237-249.
- LEIDL, W., H. BOSTEDT, R. STOLLA, W. SCHEFELS und A. KUHN (1977):
Zur Wirkung von Prostaglandin F 2 alpha sowie über klinische Erfahrungen mit dem Analog "Estrumate", insbesondere bei der Anöstrie des Rindes.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 90, 309-314.
- LEIDL, W., R. STOLLA, C. HUNDSCHHELL und H. BOSTEDT (1979):
Zur Ovarialzyste des Rindes: 1. Klassifizierung und Diagnose.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 92, 369-376.
- LOSSERT, J., D. LANDMANN, J. KÜSTER und W. HOLTZ (1986):
Vergleich zweier Enzymimmunoassays zur Progesteronbestimmung in Milch und Blutserum von Pferd und Rind und im Blutserum vom Schwein.
Zuchthyg. 21, 241-246.
- LÖVESTAD, A. (1981):
Klinische Untersuchung über den Einfluß von GnRH auf Ovarien und Uterus post partum beim Rind.
Vet.med.Diss., München.
- MacFARLANE, J.S., J.M. BOOTH, D.W. DEAS and B.G. LOWMAN (1977):
Pregnancy test and evaluation of embryonic and fetal mortality based on progesterone concentrations in fore-milk.
Vet.Rec. 100, 565-566.
- MARKETTE, K.L., G.E.Jr. SEIDEL and R.P. ELSDEN (1985)
Estimation of embryonic losses in bovine embryo transfer recipients from progesterone profiles and returns to estrus.
Theriogenology 23, 45-62.
- MATHER, E.C., P.M. CAMPER, F. VAHDAT, H.L. WHITMORE and B.G. GUSTAFFSSON (1978):
Assessment of ovarian activity in the postpartum dairy cow by use of a milk progesterone assay.
Theriogenology 10, 119-129.
- McCAUGHEY, W.J. and F.J. GORDON (1979):
Milk progesterone assay: A comparison of inter-quarter and sampling time variation.
Br.vet.J. 135, 512-518.
- McCRACKEN, J.A. (1964):
Progesterone in body fat of the dairy cow.
J.Endocrinology 28, 339-340.

McPHEE, I.M. and M.P. TIBERGHIE (1987):

Assessment of pregnancy in sheep by analysis of plasma progesterone using an amplified enzyme immunoassay technique.
Vet.Rec. 121, 63-65.

METZGER, E., R. FREYTAG und W. LEIDL (1972):

Gerät zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit des Vaginalschleims für die Brunstfeststellung beim Rind.
Zuchthyg. 7, 56-61.

MEYER, H.H.D., B. GÜVEN und H. KARG (1986):

Enzymimmuntests (EIA) auf Mikrotitrationsplatten zur Progesteronbestimmung in Magermilchproben.
Wien.tierärztl.Mschr. 73, 86-94.

MORROW, D.A., S.J. ROBERTS, K. McENTEE and H.G. GRAY (1966):

Postpartum ovarian activity and uterine involution in dairy cattle.
J.Am.Vet.Med.Ass. 149, 1596-1609.

MURPHY, B.E.P., W. ENGELBERG and C.J. PATTER (1963):

Simple method for the determination of plasma corticoids.
J.Clin.Endocrinology 23, 293-300.

NAKAO, T., M. TSURUBAYASHI, S. HORIUCHI, T. NOMURA, Y. ISHIBASHI, M. KUBO and K. KAWATA (1979):

Effects of a systematic application of human chorionic gonadotropin, gonadotropin-releasing hormone analog and bovine anterior pituitary gonatropin in cows with cystic ovarian disease.
Theriogenology 11, 385-397.

NAKAO, T (1980):

Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum.
Acta endocrinol. 93, 223-227.

NAKAO, T., A. SUGIHASHI, Y. ISHIBASHI, E. TOSA, Y. NAKAGAWA, H.

YUTO, T. NOMURA, T. OHE, S. ISHIMI, H. TAKAHASHI, M. KOIWA, N. TSUNDA and K. KAWATA (1982):

Use of milk progesterone enzyme immunoassay for early pregnancy diagnosis in cows.
Theriogenology 18, 267-274.

NAKAO, T., A. SUGIHASHI, N. SAGA, N. TSUNODA and K. KAWATA (1983a):

An improved enzymeimmunoassay of progesterone applied to bovine milk.
Br.vet.J. 139, 109-118.

NAKAO, T., A. SUGIHASHI and K. KAWATA (1983b):

Milk progesterone levels in cows with normal or prolonged oestrous cycles, referenced to an early pregnancy diagnosis.
Jap.J.Vet.Sci. 45, 495-499.

NAKAO, T., A. SUGIHASHI, N. SAGA, N. TSUNODA and K. KAWATA (1983c)

Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst, luteal cysts and cystic Corpus luteum in cows.

Am.J.Vet.Res. 44, 888-890.

NAKAO, T., A. SUGIHASHI, K. KAWATA, H. NAKAMURA, J. SHIRAKAWA, M. LINUMA, M. TSURUBAYASHI and S. HORIUCHI (1985):

Effects of an analog of PGF 2 alpha (ONO-1052) on cows with luteinized ovarian cysts following treatment with GnRH analog (Fertrelin acetate).

Theriogenology 24, 425-433.

OIKAWA, M., T. NAKAO, M. MORIYOSHI and K. KAWATA (1987):

Reliability and practical values of polystyrene bead-solid phase EIA kit of progesterone in defatted milk from cows.

Jap.J.Anim.Reprod. 33, 64-72.

OKUDA, K., S. KLEEBERG-RUPPERT und W. LEIDL (1984):

Histologische und hormonelle Untersuchungen am Corpus luteum periodicum des Rindes.

Zuchthyg. 19, 169-181.

OLTNER, R. and L.E. EDQVIST (1981):

Progesterone in defatted milk: its relation to insemination and pregnancy in normal cows as compared with cows on problem farms and individual problem animal.

Br.vet.J. 137, 78-87.

ORDONEZ, H., J. HAHN, R. ROSELIUS und W. ROMANOWSKI (1982):

Ergebnisse von Progesteronuntersuchungen bei Empfängertieren im Rahmen des Embryotransfers.

Zuchthyg. 17, 105-106.

OSCHMANN, S.J. (1985):

Sekretionsmuster einiger Steroidhormone während der Gravidität und der Post-Partum-Phase beim Rind.

Vet.med.Diss., München.

PENNINGTON, J.A., S.L. SPAHR and J.R. LODGE (1976):

Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration in milk.

J.Dairy Sci. 59, 1528-1531.

PENNINGTON, J.A., S.L. SPAHR and J.R. LODGE (1981):

Influence on progesterone concentration in bovine milk.

J.Dairy Sci. 64, 259-266.

PENNINGTON, J.A., L.H. SCHULTZ and W.F. HOFFMAN (1985):

Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding: Field study in dairy cattle.

J.Dairy Sci. 68, 2740-2745.

- PETERS, A.R. and G.E. LAMMING (1986):
Regulation of ovarian function in the post-partum cow; An endocrine model.
Vet.Rec. 118, 236-239.
- PETHES, G., M. KULCSAR, L. SÁNDOR, P. SOOR and S. CSECH (1983):
Efficiency control of embryo transfer by progesterone analysis in recipient heifers.
Acta vet. 31, 193-199.
- POPE, G.S., J. MAJZLIK, P.J.H. BALL and J.D. LEAVER (1976):
Use of progesterone concentration in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle.
Br.vet.J. 132, 497-506.
- POPE, G.S. and J.K. SWINBURNE (1980):
Reviews of the progress of dairy Science: Hormones in milk: Their physiological significance and values as diagnostic aids.
J.Dairy Res. 47, 427-449.
- RAJAKOSKI, E. (1960):
The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations.
Acta Endocrinol. Suppl. 52, 1-68.
- RANDOLPH, H.E. and R.E. ERWIN (1974):
Influence of mastitis on properties of milk. X. Fatty acid composition.
J.Dairy Sci. 57, 865-868.
- RATTENBERGER, E. and O. GÜNZLER (1979):
Procedure and organization of progesterone assay in milkfat als provided by cattle health service in Bavaria.
Proc.Intern.Congr."Application of radioimmunoassay and related methods in animal science", Warsaw.
- RATTENBERGER, E. (1985):
Der Milchprogesterontest (MPT): Ein Methodenvergleich aus der Sicht des Routinelabors.
Zuchthyg. 20, 169-183.
- REIMERS, T., S.K. NEWMAN, R.G. COWAN, D. SMITH, N. LEIN and T.R. ROUNSAVILLE (1981):
Survey of estrus detection and early pregnancy rates in dairy cows of the North east.
J.Anim.Sci. 53, Suppl. 1, 361.
- REMSEN, L.G. and J.D. ROUSSEL (1982):
Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer.
Theriogenology 18, 365-372.

- RHODES, R.C., R.D. RANDEL and C.R. LONG (1982):
Corpus luteum function in the bovine: In vivo and in vitro evidence for both a seasonal and breed type effect.
J. Anim. Sci. 55, 159-167.
- ROBERTS, S.J. (1986):
Hormonal disturbances resulting in infertility.
In: Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology), 478-494, 3. Auflage, Edward Brothers Inc., Ann Arbor, Michigan.
- ROY, J.H.B., M.W. PERFITT, R.G. GLENCROSS and A. TURVEY (1985):
Performance and progesterone and oestradiol-17 β concentrations in fat-free milk of a cow with a cystic ovarian follicle.
Vet. Rec. 116, 370-371.
- SALISBURY, G.W., N.L. VANDEMARK and J.R. LODGE (1978):
The estrous cycle.
In: Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle, 52-83, 2. Auflage, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- SAUER, M.J., J.A. FOULKES and P.M. O'NEILL (1982):
Use of microtitre plate EIA for direct determination of progesterone in whole milk: application of heterologous systems for improved sensitivity.
Br. vet. J. 138, 522-532.
- SAUER, M.J., J.A. FOULKES, A. WORSFOLD and B.A. MORRIS (1986):
Use of progesterone 11-glucuronide-alkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre-plate enzymeimmunoassay of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle.
J. Reprod. Fert. 76, 375-391.
- SAUMANDE, J. and J. FONTAINE (1984):
Early diagnosis of pregnancy in the cow from blood samples not centrifuged immediately; effect of hemolysis.
Bull. Mens. Soc. Vet. Prat. France 68, 647-660.
- SAUMANDE, J., D. TAMBOURA and D. CHUPIN (1985):
Changes in milk and plasma concentrations of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationships with number of ovulations and embryos collected.
Theriogenology 23, 719-731.
- SCHALLENBERGER, E., M. QUACK, H. KARG und E. GRUNERT (1984):
Erfolgskontrolle tierärztlicher Maßnahmen mit Hilfe des Milchprogesteronetests.
Zuchthyg. 19, 112.
- SCHALM, O.W. (1960):
Ein neuer Mastitis-Test.
Tierärztl. Umschau 15, 151-153.

- SCHAMS, D. und H.D. BUTZ (1972):
Zeitliche Beziehungen zwischen Brunstsymptomen, elektrischen Widerstandsänderungen des Vaginalschleims, präovulatorischer Ausschüttung des Luteinisierungshormons und Ovulation beim Rind. Zuchthyg. 7, 49-56.
- SCHAMS, D., E. SCHALLENBERGER, B. HOFFMANN and H. KARG (1977):
The oestrous cycle of the cow: hormonal parameters and time relationships concerning oestrus, ovulation and electrical resistance of the vaginal mucus.
Acta Endocrinol. 86, 180-192.
- SCHIAVO, J.J., R.L. MATUSZCZAK, E.A.B. OLTENACU and R.H. FOOTE (1975):
Milk progesterone in postpartum and pregnant cows as a monitor of reproductive status.
J.Dairy Sci. 58, 1713-1716.
- SCHILLING, E., D. SMIDT, E. FARRIES und A. PFAU (1982):
Verhalten einiger Blutparameter zur Progesteronsekretion bei der Kuh in der post partum-Phase.
Zuchthyg. 17, 98.
- SHELFORD, J.A., T. GRIENTH-WAITE, S. BARRINGTON, R.G. PETERSON and L.J. FISCHER (1979):
Milk sampling methods for a progesterone assay for early pregnancy.
Can.J.Anim.Sci. 59, 77-82.
- SHEMESH, M., N. AYALON and H.R. LINDNER (1968):
Early effect of conceptus on plasma progesterone levels in the cow.
J.Reprod.Fert. 15, 161-164.
- SHEMESH, M., N. AYALON and H.R. LINDNER (1973):
Early pregnancy diagnosis based upon plasma progesterone levels in the cow and ewe.
J.Anim.Sci. 36, 726-729.
- SCHNEEBELI, J. und E. EGGENBERGER (1985):
Klinische Untersuchungen über die Follikelbildung auf dem Rinderovar.
Schweiz.Arch.Tierheilk. 127, 213-230.
- SPECKER, C.D. (1980):
Erfassung des Besamungserfolges mit Hilfe des Progesterontestes unter Berücksichtigung tierzüchterischer Aspekte.
Vet.med.Diss., München.
- STABENFELDT, G.H., L.L. EWING and L.E. McDONALD (1969):
Peripheral plasma progesterone levels during the bovine oestrous cycle.
J.Reprod.Fert. 19, 433-442.

STANLEY, C.J., F. PARIS, A. PLUMB, A. WEBB and A. JOHANNSON (1985a):

Enzyme amplification: A new technique for enhancing the speed and sensitivity of enzyme immunoassay.
Clin.Products 4, 44-51.

STANLEY, C.J., A. JOHANNSON and C.J. SELF (1985b):

Enzyme amplification can enhance both the speed and the sensitivity of immunoassay.
J.Immunol.Meth. 83, 89-95.

STANLEY, C.J., F. PARIS, A.E. WEBB, R.B. HEAP, S.T. ELLIS, M. HAMON, A. WORSFOLD and J.M. BOOTH (1986):

Use of a new and rapid milk progesterone assay to monitor reproductive activity in the cow.
Vet.Rec. 118, 664-667.

STOLLA, R., H. BOSTEDT, V. WENDT und W. LEIDL (1980):

Zur Ovarialzyste des Rindes. III. Vergleichende Wertung von Therapieverfahren.
Berl.Munch.Tierärztl.Wschr. 93, 4-10.

STOLLA, R. und B. HIMMER (1980):

Probleme bei rektaler Untersuchung der Ovarien.
Prakt.Tierarzt 61, Collegium Veterinarium X, 9-13.

TAMBOURA, D., D. CHUPIN and J. SAUMANDE (1985):

Superovulation in cows: A relationship between progesterone secretion before ovulation and the quality of embryos.
Anim.Reprod.Sci. 8, 327-334.

THATCHER, W.W. and C.J. WILCOX (1973):

Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow.
J.Dairy Sci. 56, 608-610.

THEISSEN, B. (1986):

Erprobung eines neuen Enzymimmunoassays im Mikrotiterverfahren zur Progesteronbestimmung in Blut und Milch von Stuten.
Vet.med.Diss., Bonn.

THIBIER, M., J.F. FOURBERT and M. PAREZ (1976):

Relationship between milk progesterone concentration and milk yield, fat and total nitrogen content.
Br.vet.J. 132, 477-486.

THUN, R., E. EGGENBERGER, K. ZEROBIN, P. SUMMERMATTER,

A. FLÜKIGER und C. GAILLARD (1980):

Praktische Erfahrung mit dem Milch-Progesteron-Test (MPT) zur Brunst und Non-return-Diagnose beim Rind.
Zuchthyg. 15, 7-14.

VALE-FILHO, V.R., L.E.L. PINHEIRO and P.K. BASRUR (1986):

Reproduction in Zebu cattle:
In: Current Therapy in Theriogenology, 437-442, 2. Auflage,
D.A. Morrow, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

- VAN DE WIEL, D.F.M., J. VAN ELDIK, W. KOOPS, A. POSTMA and J.K. OLDENBROEK (1978):
Fertility control in cattle by use of the "milk progesterone test".
Tijdschr. Diergeneesk. 103, 91-13.
- VAN DE WIEL, D.F.M., C.H.J. KALIS and S.N.H. SHAH (1979):
Combined use of milk progesterone profiles, clinical examination and oestrous observation for the study of fertility in the post-partum period of dairy cows.
Br.vet.J. 135, 568-577.
- VAN DE WIEL, D.F.M., M. KAMONPATANA, C. NGRAMSURIJAROY, W. KOOPS and J. SINNGHAJAN (1982):
Enzymeimmunoassay for milk progesterone: its application to oestrus confirmation and early pregnancy diagnosis in cattle.
The Vet. Quarterly 4, 72-78.
- VAN DE WIEL, D.F.M. and W. KOOPS (1982):
Direct measurement of progesterone in milk and plasma by a sensitive and simple enzymeimmunoassay.
Br.vet.J. 138, 454.
- VAN DE WIEL, D.F.M. and W. KOOPS (1986):
Development and validation of enzyme immunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma.
Anim.Reprod.Sci. 10, 201-213.
- VINES, D.T., B.F. JENNY, R.E. WRIGHT and L.W. GRIMES (1986):
Variation in milk fat, protein, and somatic cell count from four dairy herd improvement laboratories.
J.Dairy Sci. 69, 2219-2223.
- VOLLER, R., A. BARLETT and D.E. BIDWELL (1978):
Enzyme immunoassay with special reference to ELISA techniques.
J.Clin.Path. 31, 507-520.
- VOOGD, C.E., C.E. VAN DE STEL and J.J. JACOBS (1980):
On the mutagenic action of some immunoassay substrates.
J.Immunological Methods 36, 55-61.
- WANG, H.X., R.A. STOLT, G.H.G. THORPE, D.J. KRICKS, D. HOLDER and B.T. RUDD (1984):
An enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay for serum progesterone.
Steroids 44, 317-328.
- WEBER, E. (1972):
Grundriß der biologischen Statistik.
7. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- WENDT, K., H. MIELKE und H.W. FUCHS (1986):
Zusammensetzung der Milch.
In: Euterkrankheiten, 136-157, 1. Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

WISE, H.T., D. CATON, W.W. THATCHER, D.H. BARRON and M.J. FIELDS (1982):

Ovarian function during the estrous cycle of the cow: ovarian blood flow and progesterone release rate.

J.Anim.Sci. 55, 627-637.

WHITMORE, H.L., J.P. HURTGEN, E.C. MATHER and B.E. SEGUIN (1979):

Clinical response of dairy cattle with ovarian cysts to single or repeated treatments of gonadotropin-releasing hormone.

J.Am.Vet.Med.Ass. 174, 1113-1115.

WORSFOLD, A.I., J.M. BOOTH, P.W. WELLS, A.C. HUDDART and C.J. STANLEY (1987):

The evaluation of a new rapid milk progesterone test as an aid to improving dairy herd fertility.

Br.vet.J. 143, 83-87.

YALOW, R.S. and S.A. BERSON (1959):

Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.

Nature 184, 1648-1649.

YASUHARA, T. und S. KLEEGERG-RUPPERT (1984):

Erfahrungen mit dem Enzymimmunoassay zur Progesteronbestimmung, insbesondere in Gesamtmilch ohne Extraktion.

Tierärztl.Umschau 39, 687-692.

Herrn Professor Dr. W. Leidl danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die freundliche Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und meines Aufenthaltes in München.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Ambulanz der Gynäkologischen Tierklinik München und Frau Schüssler, die die Durchführung der Arbeit in der Praxis und die Progesteronbestimmung mittels RIA ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. K. Osterkorn danke ich für die gewährte Hilfestellung bei den statistischen Berechnungen.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern und Doktoranden der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München und meinen Freunden, die mir ihre bereitwillige, freundschaftliche und verständnisvolle Unterstützung während meiner Arbeit und meines Aufenthaltes in Deutschland gegeben haben danken. Hier gilt mein herzlicher Dank insbesondere Frau Dr. A. Stock und Dr. T. Würgau sowie Herrn Heiner Lüps.

Der DANIDA Mission, Dar-es-Salaam, Tansania und der Sokoine University of Agriculture gilt mein Dank für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

LEBENS LAUF

Frederick Obed Kapaya Mgongo, geboren am 13.05.1948 als 2. Kind in Tabora, Tansania.

Eltern: Obed Mgongo und Iwonge Aneth, geb. Mpama.

Familienstatus: 1979 Heirat mit Frau Sophia Nyamizi, geb. Mabula.

Kinder: Upendo-Kimwaga und Iwonge

1956 - 1960	Besuch der Grundschule (Primary school)
1960 - 1963	Mittelschule (Middle school)
1964 - 1967	Oberschule (Secondary school)
1968 - 1969	Gymnasium (High school)
1970	Wehrdienst - Makutupora National Service
1970 - 1974	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität Nairobi, Kabete, Kenia
Ab 1974	Lehrtätigkeit an der Tierärztlichen Fakultät der Sokoine University of Agriculture, Tansania
1976 - 1977	Spezialisierung im Bereich Gynäkologie an der Tierärztliche Hochschule, Oslo, Norwegen
1977 - 1978	Studium des Master of Science an der Universität Nairobi, Kabete, Kenia
1984 - 1985	Besuch der Deutschkurse für Ausländer in München

Seit November 1985 bin ich an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

